

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología.

**Estudio de los regulones de las proteínas Hfq y Crc de
Pseudomonas putida, y de la expresión del ARN
pequeño CrcZ que controla la actividad de estas
proteínas.**

Tesis Doctoral
Dione L. Sánchez Hevia
Abril, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología.

Estudio de los regulones de las proteínas Hfq y Crc de *Pseudomonas putida*, y de la expresión del ARN pequeño CrcZ que controla la actividad de estas proteínas.

Tesis presentada para optar al título de Doctora en Microbiología
por la Universidad Autónoma de Madrid.

Dione L. Sánchez Hevia.

Directores de esta Tesis Doctoral:

Dr. Fernando Rojo de Castro.

Dra. Renata Moreno Albiger.

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca predoctoral del programa FPI del
Ministerio de Ciencia e Innovación.

Madrid, 2018



A mi familia.

“Está chupado”.

Quiero aprovechar esta oportunidad para expresar mi sincero agradecimiento a todos aquellos que me han ayudado de forma directa o indirecta a desarrollar esta Tesis Doctoral.

En primer lugar a mis directores, el Dr. Fernando Rojo de Castro y la Dra. Renata Moreno Albiger por todo lo que me han enseñado. Gracias por haber confiado en mi y haberme ayudado a crecer como profesional. Por supuesto, este agradecimiento se hace extensible a mis compañeros de laboratorio y de fatigas, así como al Dr. José Luis Martínez y los miembros de su laboratorio, con los que tantas horas de compartido. Gracias por las risas y el reconfortante soplo de aire fresco.

A mi tutor, el Dr. Aurelio Hidalgo, por su gran disposición y ayuda.

Al Programa de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación, por la concesión de la beca doctoral que me ha permitido realizar esta tesis.

Al Dr. Víctor del Lorenzo por la cesión de las estirpes KT2440, KT2442*rpoN::Ωkm* y KT2440Δ*hfq*, sin las que este trabajo no habría sido posible. Agradecer también a la Dra. Inés Canosa y el Dr. Juan Luis Ramos por la cesión de la cepa MPO401, igualmente empleada en esta tesis.

Al Dr. Tino Krell por acogerme en su laboratorio y enseñarme nuevas técnicas que me han ayudado a completar esta tesis doctoral.

A los servicios de Genómica y Proteómica del CNB, así como a todo el personal del CNB que tanto facilita nuestro trabajo.

A mis amigos que, con frecuencia desde lejos, pero con un cariño cercano y sincero, tanto ánimo y energía me han brindado.

Y como no, a ti Pelayo. Gracias por escucharme, comprenderme y animarme como ningún otro hubiera sabido. Gracias por hacer mi locura tuya. Por siempre, gracias.

Y sobre todo gracias a mis padres y mi familia, pues ha sido vuestro esfuerzo lo que me ha permitido dedicarme a esto. Y gracias también por vuestro inquebrantable apoyo y arrolladora confianza. Va por vosotros.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	9
ÍNDICE DE TABLAS	13
INDICE DE FIGURAS	15
ABREVIATURAS	19
1. RESUMEN	21
2. INTRODUCCIÓN	27
2.1. <i>Pseudomonas putida</i>	29
2.2. EL SISTEMA DE REPRESIÓN CATABÓLICA (RC) EN <i>Pseudomonas</i>	29
2.2.1. La proteína reguladora Crc	31
2.2.2. La proteína de unión al ARN Hfq	33
2.2.3. La transcripción de los ARNs pequeños CrcZ y CrcY está regulada por el sistema de dos componentes CbrA/CbrB	35
2.2.4. El ARN como molécula reguladora	38
2.3. LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO	39
2.3.1. La disyuntiva del hierro para la célula, su captación y su regulación	39
2.3.2. La homeostasis del hierro está regulada por la proteína Fur y por los ARNp PrrF1 Y PrrF2	42
3. OBJETIVOS	45
4. MATERIAL Y MÉTODOS	49
4.1. CEPAS Y PLÁSMIDOS	51
4.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	58
4.3. TÉCNICAS DE ADN	59
4.3.1. Extracción y purificación de ADN cromosómico y plasmídico	59
4.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa	59
4.3.3. Otras técnicas generales	59
4.4. MANIPULACIONES GENÉTICAS	60
4.4.1. Transformación de ADN en <i>E. coli</i>	60
4.4.1.1. Producción de células competentes mediante el método de RbCl	60
4.4.1.2. Transformación por choque térmico	60
4.4.2. Transformación de ADN en <i>P. putida</i>	60
4.4.2.1. Transformación por electroporación	60
4.4.2.2. Transformación por conjugación	61
4.4.3. Obtención de estirpes mutantes de <i>P. putida</i>	61

4.4.3.1.	Inactivación del gen <i>crc</i> de <i>P. putida</i> en la cepa parental KT2440 y en la estirpe mutante <i>hfq</i>	61
4.4.3.2.	Complementación del mutante <i>hfq</i> con el plásmido pHFQ	61
4.4.3.3.	Construcción del mutante ámbar del gen <i>cbrB</i> , KTB340	62
4.4.3.4.	Construcción del mutante ámbar del gen <i>cbrB</i> , KTB1	63
4.4.3.5.	Construcción de los plásmidos pPcbrB	64
4.4.3.6.	Construcción de los plásmidos pPprf1 y pPprf2	65
4.4.3.7.	Construcción de los plásmidos pPexbB, pPdctM y pPdctP	65
4.5.	TÉCNICAS DE ARN	66
4.5.1.	Extracción de ARN	66
4.5.2.	Tratamiento del ARN purificado con DNasa I	66
4.5.3.	Síntesis de ADN complementario (ADNc)	66
4.5.4.	PCR cuantitativa o PCR a tiempo real (RT-qPCR)	67
4.5.4.1.	Curvas estándar de validación de los oligonucleótidos	67
4.5.4.2.	Cuantificación relativa	67
4.5.5.	Determinación del inicio de transcripción	68
4.5.5.1.	5' RACE	68
4.5.5.2.	Extensión del cebador o <i>Primer extension</i>	68
4.5.6.	Northern Blot	69
4.5.6.1.	Construcción de las sondas de ARN	70
4.5.6.2.	Cuantificación	70
4.5.7.	Ensayos de retardo en gel (EMSA)	70
4.5.7.1.	Síntesis y marcaje radioactivo de los ARN	71
4.6.	MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	71
4.6.1.	Ensayo de actividad β -galactosidasa	71
4.6.2.	Curvas de crecimiento.....	71
4.6.3.	Ensayo de motilidad tipo <i>swimming</i>	72
4.6.4.	Visualización de pioverdina en cultivos líquidos	72
4.6.5.	Cuantificación de pioverdina en placas de agar	72
4.6.6.	Fotografía de células con microscopio óptico	73
4.7.	ENSAYOS DE TRANSCRIPTÓMICA Y PROTEÓMICA	73
4.7.1.	Análisis del transcriptoma mediante ensayo de RNA-Seq	73
4.7.1.1.	Análisis de datos	73
4.7.2.	Análisis del proteoma mediante iTRAQ	74
4.7.2.1.	Preparación de las muestras	74
4.7.2.2.	Etiquetado para el iTRAQ	75
4.7.2.3.	Cromatografía líquida y espectrometría de masas	75
4.7.2.4.	Análisis de datos	75
4.8.	OTROS ENSAYOS	76
4.8.1.	Cuantificación de la concentración de hierro mediante Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)	76
4.8.2.	Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	76
5.	RESULTADOS	79

5.1. PAPEL DEL ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL CbrB EN LA REGULACIÓN DE CrcZ Y CrcY. SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO DEL TRÁNSCRITO CrcZ*	81
5.1.1. Análisis del transcrito CrcZ procesado (CrcZ*)	81
5.1.1.1. Identificación del inicio de transcripción del transcrito largo que incluye a <i>crcZ</i>	81
5.1.1.2. Análisis del procesamiento del transcrito largo que incluye a <i>crcZ</i>	83
5.1.2. Estudio de los fenotipos generados por la ausencia de CbrB o de CrcZ* ...	86
5.1.2.1. Construcción de los mutantes traduccionales de <i>cbrB</i> KTB1 y KTB340	87
5.1.2.2. Efecto de las mutaciones traduccionales <i>cbrB1</i> y <i>cbrB340</i> en los niveles de los ARNp CrcZ y CrcY	88
5.1.2.3. Efecto de las mutaciones <i>cbrB1</i> y <i>cbrB340</i> sobre el crecimiento celular	89
5.1.3. Análisis de la actividad del promotor <i>PcbrB</i>	91
5.1.3.1. Efecto de la secuencia del gen <i>cbrB</i> sobre su propio promotor <i>PcbrB</i>	91
5.2. ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS NUCLEOPROTEICOS DE Crc, Hfq Y ARN MEDIANTE MICROCALORIMETRÍA	95
5.3. EFECTO DE LA INACTIVACIÓN DE LOS GENES <i>hfq</i> Y <i>crc</i> EN CÉLULAS CRECIENDO EN MEDIO MÍNIMO CON SUCCINATO	97
5.3.1. Primer análisis transcripcional (RNA-Seq) y descripción de la cepa KT2440-FR	98
5.3.2. Segundo análisis transcripcional (RNA-Seq) utilizando la cepa KT2440 y los mutantes isogénicos derivados de ella	100
5.3.2.1. Visión general de los resultados del RNA-Seq y comprobación por RT-qPCR	100
5.3.3. Posible efecto de Hfq en la regulación de los profagos	104
5.3.4. Análisis comparativo del proteoma de las cepas analizadas (iTRAQ)	105
5.3.5. Función de Crc en medio MMScc	107
5.3.6. Hfq afecta a la homeostasis del hierro	108
5.3.6.1. Hfq afecta a la producción de pioverdina	110
5.3.6.2. Comparación de los niveles de hierro intracelular	113
5.3.6.3. Estudio de la influencia de Hfq y Crc sobre la expresión del complejo TonB	114
5.3.6.4. Influencia de Hfq y Crc en la expresión y niveles de los ARNp PrrF1 y PrrF2	116
5.3.7. La inactivación de <i>hfq</i> provoca un cambio morfológico en fase estacionaria tardía, pero sólo en medio rico LB	121
5.3.8. Efecto aditivo de la inactivación de <i>hfq</i> y <i>crc</i> : Motilidad tipo <i>swimming</i> ..	122
6. DISCUSIÓN	125
6.1. CAPÍTULO 1. Papel del activador transcripcional CbrB en la regulación de CrcZ y CrcY. Síntesis y procesamiento del transcrito CrcZ*	127
6.1.1. Síntesis y procesamiento del transcrito CrcZ	127

6.1.2.	Análisis de la actividad del promotor <i>PcbrB</i>	130
6.2.	CAPÍTULO 2. Análisis de la formación de complejos nucleoproteicos de Crc, Hfq y ARN mediante microcalorimetría	131
6.3.	CAPÍTULO 3. Efecto de la inactivación de los genes <i>hfq</i> y <i>crc</i> en células creciendo en medio mínimo con succinato	132
6.3.1.	Descripción de la estirpe KT2440-FR	132
6.3.2.	Función de Crc en medio MMScC	132
6.3.3.	Función de Hfq en medio MMScC	134
6.3.4.	Efecto conjunto de la ausencia de Hfq y Crc	138
7.	CONCLUSIONES	139
8.	BIBLIOGRAFÍA	143
9.	MATERIAL SUPLEMENTARIO	157
10.	ANEXOS: ARTÍCULOS	179

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Cepas de <i>E. coli</i> y <i>P. putida</i> empleadas.	51
Tabla 2 Plásmidos utilizados.	52
Tabla 3 Oligonucleótidos utilizados en procesos de manipulación génica.	54
Tabla 4 Cebadores utilizados en ensayos de RT-qPCR.	56
Tabla 5 Efecto de las diferentes mutaciones $\Delta cbrB$ sobre la abundancia de ARN de <i>crcZ</i> , <i>crcY</i> y <i>cbrB</i>	88
Tabla 6 Comprobación mediante RT-qPCR de los resultados de la transcriptómica en un número seleccionado de genes.	103
Tabla 7 Genes relacionados con la homeostasis del hierro (síntesis, salida y captación de sideróforos y almacenamiento de hierro) que sufren un incremento (en rojo) o un descenso de expresión (en verde) en los mutantes KTVC (indicado como 1), KT2440 Δhfq (indicado como 2) y/o KTHC (indicado como 3) respecto a la estirpe silvestre.	110
Tabla S1 Genes cuyos niveles de ARN son mayores o menores en el mutante <i>crc</i> (KTVC) que en la estirpe silvestre, en MMSc y fase exponencial (0,6 A ₆₀₀). Se han seleccionado los genes cuyos niveles de ARN cambian más de ± 3 veces ($\log_2FC \geq 1,585 $ y $FDR \leq 0,01$), indicando en rojo los que están más expresados y en verde los que están menos expresados.	159
Tabla S2 Genes cuyos niveles de ARN son mayores o menores en el mutante <i>hfq</i> (KT2440 Δhfq) que en la estirpe silvestre, en MMSc y fase exponencial (0,6 A ₆₀₀). Se han seleccionado los genes cuyos niveles de ARN cambian más de ± 3 veces ($\log_2FC \geq 1,585 $ y $FDR \leq 0,01$), indicando en rojo los que están más expresados y en verde los que están menos expresados.	161
Tabla S3 Genes cuyos niveles de ARN son mayores o menores en el mutante doble <i>hfq crc</i> (KTHC) que en la estirpe silvestre, en MMSc y fase exponencial (0,6 A ₆₀₀). Se han seleccionado los genes cuyos niveles de ARN cambian más de ± 3 veces ($\log_2FC \geq 1,585 $ y $FDR \leq 0,01$), indicando en rojo los que están más expresados y en verde los que están menos expresados.	165
Tabla S4 Proteínas cuya abundancia es mayor (indicadas en rojo) o menor (indicadas en verde) en los mutantes <i>crc</i> (KTVC), <i>hfq</i> (KT2440 Δhfq) y <i>hfq crc</i> (KTHC) respecto a la estirpe silvestre KT2440, en MMSc a 0,6 A ₆₀₀ . Se muestran todas las proteínas detectadas cuya abundancia cambia en al menos uno de los mutantes ($q\text{-valor} \leq 0,05$, indicado en amarillo; y $\log_2FC \geq 0,49 $). Las proteínas no detectadas se señalan con "nd". También se indica cuáles de estos genes presentan un motivo CA cerca de su inicio de traducción.	171
Tabla S5 Efecto de la inactivación de <i>hfq</i> y/o <i>crc</i> sobre el nivel de los ARN (medido por RNA-Seq) y de proteína (medido por iTRAQ) de los genes relacionados con la homeostasis del hierro. Se indican los valores de \log_2FC obtenidos en los correspondientes ensayos de	

transcriptómica y de proteómica, en los que se compara la estirpe silvestre KT2240 con los mutantes *crc* (KTVC), *hfq* (KT2440Δ*hfq*) y *hfq crc* (KTHC), en medio MMScc a 0,6 A₆₀₀. Se ha interpretado como cambio aquellos genes cuyo nivel de ARN cambia más de ± 3 veces ($\log_2FC \geq |1,585|$; $FDR \leq 0,01$), y cuyo nivel de proteína cambia más de ± 1,4 veces ($\log_2FC \geq |0,49|$; $q\text{-valor} \leq 0,05$). Rojo, mayor expresión en el mutante; verde menor expresión en el mutante; "sc", sin cambio; "nd" no detectado. 175

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Modelo de la represión catabólica mediada por las proteínas Hfq y Crc y los ARNp CrcZ y CrcY en <i>P. putida</i>	31
Figura 2 Organización genómica de los ARN pequeños CrcZ, CrcY y CrcX en diferentes especies de <i>Pseudomonas</i>	36
Figura 3 Estructura, producción y captación de pioverdina en las bacterias del género <i>Pseudomonas</i>	41
Figura 4 Esquema de la recombinación e integración de pEMG-cbrB340 en el cromosoma de <i>P. putida</i>	63
Figura 5 Esquema del proceso SOE-PCR para la incorporación de una mutación puntual. ..	64
Figura 6 Actividad β -galactosidasa de las diferentes fusiones <i>cbrB-lacZ</i>	82
Figura 7 Influencia de Crc, Hfq, IHF y RpoN en la actividad el promotor <i>PcbrB</i> en medio LB (0,5 A ₆₀₀).	83
Figura 8 Identificación del extremo 5' de los transcritos de <i>crcZ</i> presentes en la estirpe parental <i>P. putida</i> KT2442 (wt) y en el mutante KT2442 <i>rpoN::Ωkm</i> (Δ <i>rpoN</i>).	85
Figura 9 Identificación por Northern Blot de los niveles de CrcZ presentes en las cepas KT2442 (wt), MPO401 (Δ <i>cbrB</i>) y KT2442 <i>rpoN::Ωkm</i> (Δ <i>rpoN</i>), comparando los ARNs primarios (muestra tratada con TEX) y los procesados (sin tratar con TEX).	86
Figura 10 Representación de los dominios de la proteína CbrB y de sus derivadas CbrB*1 y CbrB*340.	87
Figura 11 Efecto de las mutaciones traduccionales <i>cbrB1</i> y <i>cbrB340</i> en la actividad de la fusión <i>PcbrB-lacZ</i>	89
Figura 12 Efecto de los distintos mutantes <i>cbrB</i> en el crecimiento de la bacteria en diferentes medios.	90
Figura 13 Análisis de la actividad del promotor <i>PcbrB</i>	92
Figura 14 Comparación de la abundancia de transcrito y de la actividad β -galactosidasa en las fusiones <i>PcbrBfw1rv8-lacZ</i> , <i>PcbrBfw1rv8-lacZ</i> y <i>PcrcZ-lacZ</i>	92
Figura 15 Análisis de la actividad del promotor <i>PcbrB</i> en función de la porción de gen <i>cbrB</i> contenida en la fusión.	94
Figura 16 Estimación de la cinética de unión de Hfq y/o Crc al ARN <i>alkS</i> medida por ITC. ...	96

Figura 17 Crecimiento de la estirpe <i>P. putida</i> KT2440 y de sus derivados <i>crc</i> (KTVC), <i>hfq</i> (KT2440Δ <i>hfq</i>) y <i>hfq crc</i> (KTHC) en MMScC, el medio donde se ha llevado a cabo el ensayo de transcriptómica.	97
Figura 18 Sección del alineamiento de lecturas de ARN, visualizadas mediante el programa IGV, de la región comprendida entre los genes PP2217 y PP2265, correspondientes al ensayo de RNA-Seq en el que se compararon las cepas KT2440-FR, KT2440Δ <i>hfq</i> , KTCRC y KTHC.	99
Figura 19 Comparación del crecimiento de <i>P. putida</i> KT2440 y KT2440-FR.	100
Figura 20 Comparación de la motilidad tipo <i>swimming</i> en las estirpes <i>P. putida</i> KT2440 y KT2440-FR en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono.	101
Figura 21 Número de genes que, según nuestros resultados de RNA-Seq, tienen un cambio de expresión de al menos ± 3 veces ($\log_2FC \geq 1,585 $ y $FDR \leq 0,01$) en las estirpes <i>crc</i> (KTVC), <i>hfq</i> (KT2440Δ <i>hfq</i>) o <i>hfq crc</i> (KTHC) respecto a la estirpe control KT2440.	102
Figura 22 Clasificación por categorías funcionales de los genes que presentan cambio de expresión en los mutantes <i>crc</i> (KTVC), <i>hfq</i> (KT2440Δ <i>hfq</i>) o <i>hfq crc</i> (KTHC), según los resultados de la transcriptómica (y $\log_2FC \geq 1,58 $ y $FDR \leq 0,01$).	102
Figura 23 Sección del alineamiento de las lecturas del RNA-Seq con el programa IGV para la región génica correspondiente al profago 1, comparando las estirpes KT2440, KTVC, KT2440Δ <i>hfq</i> y KTHC.	104
Figura 24 Análisis de la presencia del profago 1 en la cepa silvestre (KT2440) y en el mutante <i>hfq</i> (KT2440Δ <i>hfq</i>) mediante PCR.	105
Figura 25 Proteínas cuya abundancia es mayor o menor en los mutantes <i>crc</i> (KTVC), <i>hfq</i> (KT2440Δ <i>hfq</i>), y en el mutante doble <i>hfq crc</i> (KTHC), respecto al wt KT2440.	106
Figura 26 Representación del efecto de Hfq en la expresión de genes relacionados con la síntesis de pioverdina (PVD) y captación de hierro.	109
Figura 27 Influencia de las proteínas Hfq y Crc en la producción de pioverdina en condiciones de alta disponibilidad de hierro (MMScC, 84,5 μ M Fe), o de escasez de hierro (MMlowFe, 0,3 μ M Fe).	112
Figura 28 Producción de pioverdina (PVD) en las estirpes <i>P. putida</i> KT2440 (wt), KTVC (<i>crc</i>), KT2440Δ <i>hfq</i> (<i>hfq</i>) y KTHC (<i>hfq crc</i>) en placas de agar MMScC.	113
Figura 29 Producción de PVD en las estirpes <i>P. putida</i> KT2440 (wt), KTVC (<i>crc</i>), KT2440Δ <i>hfq</i> (<i>hfq</i>) y KT2440Δ <i>hfq</i> complementada con el plásmido pHFQ.	113
Figura 30 Estimación de la concentración de hierro mediante ICP-MS en los medios de trabajo y en el interior celular.	114
Figura 31 Efecto de la inactivación de <i>crc</i> y/o <i>hfq</i> , y de la disponibilidad de hierro, en la actividad de la fusión traduccional <i>PexbB'</i> - <i>lacZ</i>	115

Figura 32 Comparación de la secuencia consenso del motivo CA (CA-cons) con los motivos CA presentes en los genes <i>tonB</i> , <i>exbB</i> y otros genes para los cuales ha sido demostrado el efecto de Crc.	117
Figura 33 Determinación del inicio de transcripción de <i>prfF1</i> y <i>prfF2</i> , y organización de su región promotora.	118
Figura 34 Detección de PrrF1 y/o PrrF2 (PrrF1-F2) mediante Northern Blot.	119
Figura 35 Efecto de la abundancia de hierro y de la ausencia de Crc y/o Hfq sobre la actividad de las fusiones <i>PprfF1-lacZ</i> y <i>PprfF2-lacZ</i>	120
Figura 36 Morfología de las células <i>P. putida</i> KT2440, <i>crc</i> (KTVC), <i>hfq</i> (KT2440 Δ <i>hfq</i>) y <i>hfq crc</i> (KTHC) tras 24 h de crecimiento en medio LB y 36 h en medio MMScc.	121
Figura 37 Comparación de la motilidad tipo <i>swimming</i> en <i>P. putida</i> KT2440 y los mutantes <i>crc</i> (KTVC), <i>hfq</i> (KT2440 Δ <i>hfq</i>) y <i>hfq crc</i> (KTHC), creciendo en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono.	123
Figura 38 Modelo de la regulación de Hfq/Crc/CrcZ.	128
Figura 39 Representación del cambio de nivel de expresión ($\log_2FC \geq 1$ y $FDR \leq 0,01$) que experimentan los genes <i>isc</i> en los mutantes <i>crc</i> (KTVC), <i>hfq</i> (KT2440 Δ <i>hfq</i>) y <i>hfq crc</i> (KTHC), respecto a la estirpe silvestre KT2440.	136

ABREVIATURAS

A continuación se describen las abreviaturas utilizadas en esta tesis:

2,2-BP: 2,2-bipiridilo	LB: medio de cultivo de caldo de lisogenia, en inglés <i>Lysogeny Broth</i>
5'UTR y 3'UTR: región 3' o 5' no traducida de un gen, del inglés <i>Untranslated región</i>	MCS: del inglés <i>Multiple cloning site</i>
A: absorbancia	min: minuto
ADN: ácido desoxirribonucleico	MM: medio mínimo
ADNc: ADN complementario	MOPS: ácido 3-(n-morfolino) propanesulfónico
Ap: ampicilina	Mbp: mega pares de bases
ARN(s): ácido(s) ribonucleico(s)	NADH: nucleótido de nicotinamida y adenina
ARNm: ARN mensajero	NRPS: sintetasa de péptido no ribosomal, del inglés <i>Nonribosomal peptide-synthetase</i>
ARNp: ARN pequeño, en inglés "sRNA".	nt: nucleótidos
ARNpol: ARN polimerasa	O/N: toda la noche, del inglés <i>Overnight</i>
ARNr: ARN ribosómico	ONPG: O-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
ARNt: ARN de transferencia	ORF: del inglés <i>Open reading frame</i>
ATP: adenosín trifosfato	pb: pares de bases
°C: grado centígrado	PCR: reacción en cadena de la polimerasa, en inglés <i>Polymerase chain reaction</i>
CA: motivo de actividad catabólica, en inglés <i>Catabolite activity motif</i>	PBP: del inglés <i>periplasmic binding protein</i>
CIP: del inglés <i>Calf intestinal phosphatase</i>	PVD: pioverdina
Cit: citrato	PVD-Fe: ferripioverdina (PVD unida a Fe)
CHAPS: del inglés 3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate	RACE: del inglés <i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
ECF-σ: factor sigma extracitoplásmico, en inglés <i>Extracytoplasmic function σ factor</i>	RBS: región de unión al ribosoma, en inglés <i>Ribosome binding site</i>
EDTA: ácido etilendiaminetetraacético	RC: represión catabólica
Fe: hierro	rpm: revoluciones por minuto
FDR: tasa de descubrimiento de falsos positivos, en inglés <i>False discovery rate</i>	Rf: rifampicina
Fru: fructosa	RT: temperatura ambiente
Fum: fumarato	RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real
Glc: glucosa	s: segundo
Gm: gentamicina	SD: desviación estándar
h: hora	SDS: dodecilsulfato sódico
HEPES: del inglés 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid	Scc: succinato
ICP-MS: espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente	Sm: estreptomycin
IGV: del inglés <i>Interactive genomes viewer</i>	SOE-PCR: del inglés <i>Splicing overlap extension PCR</i>
ITC: calorimetría de titulación isotérmica, en inglés <i>Isothermal titration calorimetry</i>	Suc: sacarosa
iTRAQ: del inglés <i>Isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>	TAE: disolución tampón Tris-acetato-EDTA
Kb: kilobase	Tc: tetraciclina
Km: kanamicina	Tyr: tirosina
	U: unidad
	X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

1. RESUMEN

RESUMEN

Pseudomonas putida KT2440 es una bacteria Gram-negativa de gran importancia biotecnológica debido, entre otras cosas, a su enorme versatilidad metabólica que le permite utilizar multitud de compuestos como fuentes de carbono y energía. El uso de estos compuestos está jerárquicamente regulado por las proteínas Hfq y Crc. Cuando en el medio hay fuentes de carbono preferentes, estas proteínas inhiben la traducción de los ARN mensajeros de genes implicados en el transporte o asimilación de fuentes de carbono no preferentes. Hfq y Crc se unen a secuencias ricas en adeninas, denominadas motivos CA, presentes en las inmediaciones del sitio de inicio de traducción de los ARN mensajeros susceptibles de regulación, impidiendo así que sean traducidos. Cuando los sustratos preferentes se han consumido, Hfq y Crc son secuestradas por los ARN pequeños CrcZ y CrcY, que contienen varios motivos CA en su secuencia, y la traducción de los ARNm de genes implicados en la asimilación de sustratos no preferidos puede tener lugar. Además de ser sintetizados desde sus propios promotores *PcrcZ* y *PcrcY*, CrcZ y CrcY también pueden originarse desde los promotores de los genes localizados por encima de ellos. En la primera parte de esta tesis doctoral hemos estudiado cómo tiene lugar este proceso en el caso de CrcZ. Hemos comprobado que desde el promotor de *cbrB*, el gen anterior a *crcZ*, se origina un transcrito que contiene *cbrB* y *crcZ* y que, tras ser procesado en un punto cercano al inicio de transcripción de *PcrcZ*, se genera un transcrito de CrcZ procesado, que hemos denominado CrcZ*, con un tamaño muy similar al transcrito CrcZ primario.

En la segunda parte de esta tesis doctoral hemos estudiado qué otras funciones ejercen Hfq y Crc, a fin de entender mejor cómo funciona su colaboración. Mediante ensayos de transcriptómica y proteómica se ha comparado el efecto que la inactivación de los genes *crc* y/o *hfq* tiene sobre la bacteria cuando ésta crece en un medio mínimo con succinato como única fuente de carbono. Los resultados obtenidos indican que el efecto de ausencia de Crc, en estas condiciones, es pequeño e indirecto, mientras que la falta de Hfq provoca un efecto más amplio. En las condiciones analizadas, el mutante *hfq* presenta menor cantidad de los ARNs pequeños PrrF1 y PrrF2 implicados en la regulación del hierro. Además, tiene afectada la expresión de numerosos genes, entre ellos los relacionados con la producción y captación del sideróforo pioverdina. Así pues, la ausencia de Hfq desregula la homeostasis del hierro, un microelemento esencial para la bacteria.

SUMMARY

Pseudomonas putida KT2440 is a Gram-negative bacterium very important in biotechnology due to its great metabolic versatility, which allows it to use a multitude of compounds as sources of carbon and energy. The assimilation of these compounds is hierarchically regulated by the Hfq and Crc proteins. When preferred carbon sources are present, these proteins inhibit the translation of the mRNAs of genes involved in the transport and/or metabolism of non-preferred compounds. Hfq and Crc bind adenine-rich sequences, called CA motifs, located adjacent to the translation initiation site of the target mRNAs, preventing translation initiation. When the preferred carbon sources are consumed, the Hfq and Crc proteins are sequestered by the small RNAs CrcZ and CrcY, which contain several CA motifs in their sequence, and translation of the mRNAs of genes involved in the transport or metabolism of non-preferred carbon sources can occur. CrcZ and CrcY are synthesized from promoters *PcrcZ* and *PcrcY*, respectively. In addition, *crcZ* and *crcY* can also be transcribed from the promoters of genes located upstream. In the first part of this doctoral thesis we have studied how this process takes place in the case of *crcZ*. We have observed that *crcZ* can be transcribed from the promoter of the *cbrB* gene, located immediately upstream of *crcZ*. The *cbrB-crcZ* transcript is processed to render a sRNA, named CrcZ*, very similar in size to the CrcZ produced from promoter *PcrcZ*.

In the second part of this work, we have studied what other functions Hfq and Crc can perform, in order to better understand how these two proteins collaborate to regulate gene expression. To this end, the effect of the inactivation of the *crc* and/or *hfq* genes when bacteria grow in a minimal salts medium with succinate has been compared using transcriptomic and proteomic assays. The results showed that, under these conditions, the lack of Crc, had a small and indirect effect, while the lack of Hfq caused a boarder effect. The Hfq-Null strain had significantly lower amounts of PrrF1 and PrrF2, the small RNAs involved in the control of iron homeostasis. In addition, the expression of several genes involved in the production and uptake of the siderophore pyoverdine was affected in this mutant. Therefore, the lack of Hfq deregulated iron homeostasis, an essential microelement for bacteria.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. *Pseudomonas putida*

El género *Pseudomonas* está compuesto por más de 200 especies de bacterias Gram-negativas del grupo γ -proteobacterias (Stanier et al., 1966). Son bacterias con genomas grandes, de entre 6 y 7 Mbp con alrededor de 5.500 genes (Nelson et al., 2002), y metabólicamente muy versátiles, capaces de utilizar más de 100 tipos de sustratos orgánicos diferentes como fuente de carbono y energía (Stanier et al., 1966), lo que les facilita habitar ambientes muy variados tales como suelos, la rizosfera, ecosistemas acuáticos, o vivir asociadas a plantas, animales y humanos (Nelson et al., 2002). Dentro de este género se encuentra *Pseudomonas putida* KT2440 (Bagdasarian et al., 1981), la estirpe empleada en el desarrollo de esta tesis doctoral. *P. putida* KT2440 deriva de la cepa *P. putida* mt-2, originalmente descrita como *P. arvilla* mt-2 (Kojima et al., 1967), capaz de degradar tolueno gracias al plásmido pWW0, el cuál no está presente en *P. putida* KT2440. A pesar de estar estrechamente relacionada con *Pseudomonas aeruginosa* o *Pseudomonas syringae*, *P. putida* KT2440 es una cepa avirulenta; de hecho fue la primera bacteria Gram-negativa certificada como cepa segura (GRAS, del inglés *Generally recognized as safe*) por el comité “*Recombinant DNA Advisory Committee*” (Federal Register, 1982); valoración que se confirmó cuando, al secuenciar el genoma de la bacteria, se evidenció la falta de factores de virulencia o patogénesis reconocibles (Nelson et al., 2002; Belda et al., 2016). Este hecho, unido a la ya comentada gran versatilidad metabólica, convierten a *P. putida* en un organismo de elección tanto en procesos biotecnológicos diversos, como de biotransformación o en biorremediación *in situ*.

2.2. EL SISTEMA DE REPRESIÓN CATABÓLICA (RC) EN *Pseudomonas*

En las bacterias, la captación y utilización de las diferentes fuentes de carbono, cuando hay varias disponibles en el medio, está jerárquicamente regulada mediante un mecanismo conocido como Represión Catabólica (RC) que, en términos generales, se encarga de prevenir la expresión de los genes relacionados con la utilización de fuentes de carbono no preferentes, permitiendo la utilización de otros compuestos más favorables. Este fenómeno fue descrito originalmente por Jaques Monod en 1942. Monod observó que en un medio con glucosa y lactosa, *Escherichia coli* crece de manera diáuxica, esto es, con dos fases de crecimiento exponencial separadas por una fase sin crecimiento, correspondiendo la primera fase de crecimiento exponencial al periodo en el que la bacteria consume la glucosa y la segunda fase de crecimiento exponencial a la etapa en la que consume la lactosa. Debido al uso preferente de la glucosa, durante la primera fase de crecimiento exponencial no se expresan aquellos genes que codifican los enzimas responsables de la degradación de la lactosa, así que se precisa de una fase intermedia sin crecimiento que sirva de adaptación para que *E. coli* comience a producir dichos enzimas (Monod, 1942).

La represión catabólica (RC) es un proceso regulador muy importante que se estima puede afectar al 5 – 10% de los genes de las bacterias (Görke and Stülke, 2008). En las bacterias heterotróficas de vida libre, como *P. putida* KT2440, la RC favorece la utilización de aquella fuente de carbono y energía disponible que permita una mayor optimización del

metabolismo y el crecimiento de la bacteria (Görke and Stülke, 2008; Rojo, 2010). Además, en el caso de los microorganismos patógenos, la RC está interconectada con otros procesos fisiológicos tales como la virulencia, que permite el acceso de la bacteria a nuevas fuentes nutrientes (Görke and Stülke, 2008).

Aunque la represión catabólica (RC) es un fenómeno regulador que aparece en muchos grupos bacterianos, el mecanismo molecular subyacente varía mucho entre los diferentes grupos. En el caso del género *Pseudomonas*, y en contraposición con lo que ocurre en las Enterobacterias, la fuente de carbono preferente no es la glucosa, sino algunos aminoácidos o ácidos orgánicos dicarboxílicos de cadena corta. El uso jerárquico y secuencial de las fuentes de carbono afecta, incluso, a los diferentes aminoácidos, pues se ha visto que *P. putida* consume preferentemente prolina, alanina, glutamato, glutamina, histidina, arginina, aspartato y asparragina (Collier et al., 1996; Morales et al., 2004; Moreno et al., 2009a; Rojo, 2010). Aunque la presencia de estos sustratos reprime el uso de glucosa, ésta mantiene cierta preferencia sobre otros compuestos secundarios, tales como hidrocarburos (como por ejemplo, tolueno; Cases et al., 1999; Cases et al., 2001a).

El fenómeno de RC de *Pseudomonas* está regulado fundamentalmente por las proteínas Hfq y Crc, que actúan de manera post-transcripcional interaccionando con los ARN mensajeros (ARNm) de los genes que codifican los reguladores, transportadores y/o enzimas encargados de degradar las fuentes de carbono no preferentes, impidiendo así su ulterior traducción (Moreno et al., 2015). Dicha interacción tiene lugar a través los motivos CA (del inglés, *catabolite activity*), unas regiones del ARN ricas en adeninas, definidas como AANAANAA (donde N representa a cualquier nucleótido), generalmente localizadas próximas al sitio de inicio de traducción de los ARNm diana (Moreno et al., 2009b; Sonnleitner et al., 2009; Sonnleitner et al., 2012). La función de Hfq y Crc es contrarrestada por el ARN pequeño (ARNp) CrcZ, el cual contiene varios motivos CA en su secuencia que le permiten unirse a las proteínas Hfq y Crc y secuestrarlas. CrcZ está presente en todas las especies de *Pseudomonas* analizadas, y muchas de ellas tienen además ortólogos similares a CrcZ en secuencia y función, como CrcY en *P. putida* (Moreno et al., 2012) y CrcX en *P. syringae* (Filitrault et al., 2013).

Al menos en medio rico LB, los niveles de proteína Crc son bastante semejantes a lo largo de la curva de crecimiento de la bacteria, siendo sólo ligeramente mayores en la fase exponencial que en la fase estacionaria (Ruiz-Manzano et al., 2005). Sin embargo, en aquellas situaciones en las que la RC es más baja (en medio con fuentes de carbono no preferentes, en fase estacionaria o durante el crecimiento a 10 °C), aumentan los niveles de los ARNp CrcZ y CrcY, encargados de antagonizar el papel de Crc y Hfq (Moreno et al., 2012; Fonseca et al., 2013; La Rosa et al., 2015). La actividad de los promotores *PcrcZ* y *PcrcY* depende del sistema de dos componentes CbrA/CbrB, el cual responde a señales actualmente no definidas que se cree están relacionadas con el balance carbono/nitrógeno (García-Mauriño et al., 2013) (Fig. 1).

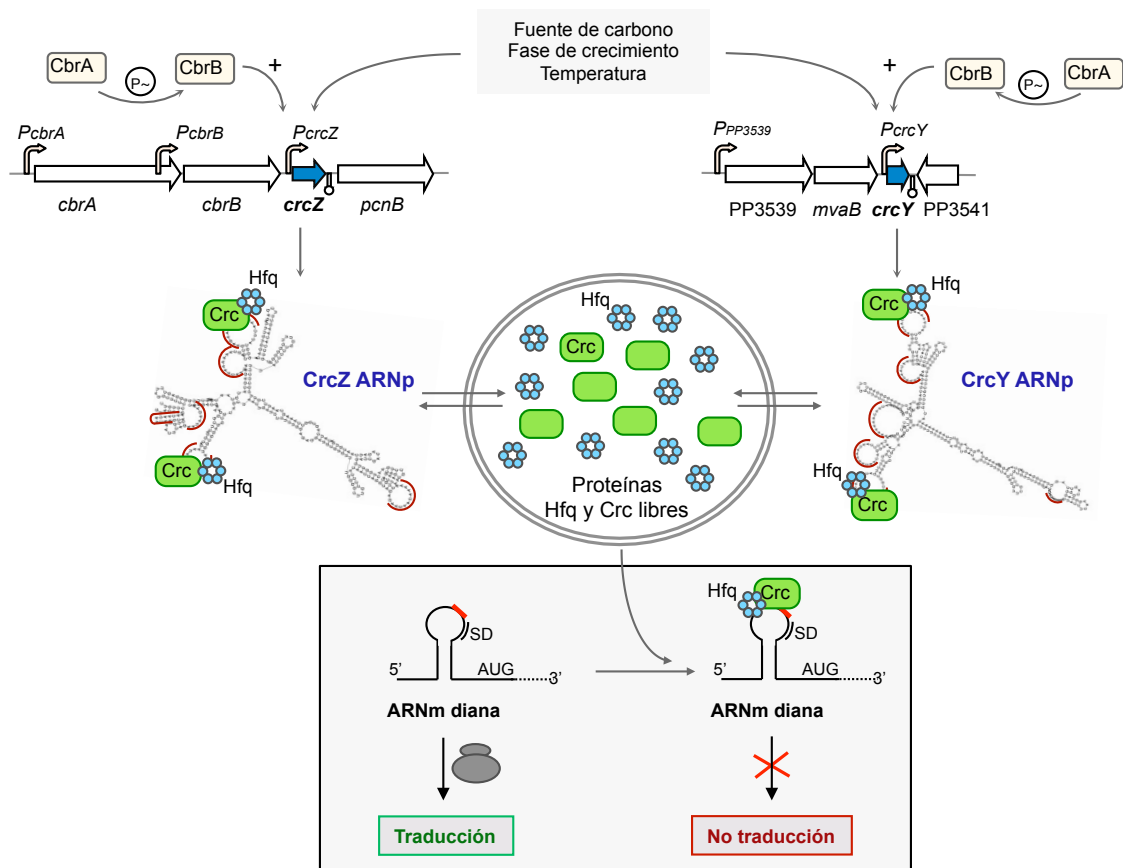


Figura 1 | Modelo de la represión catabólica mediada por las proteínas Hfq y Crc y los ARNp CrcZ y CrcY en *P. putida*. Los niveles de Hfq y Crc varían poco, pero CrcZ y CrcY cambian mucho en función de la fuente de carbono, la fase de crecimiento y la temperatura. En una condición de alta represión catabólica, como sería cuando las células crecen en un medio rico, en fase exponencial a temperatura óptima (30 °C), los niveles de CrcZ y CrcY son bajos, con lo que las proteínas Hfq y Crc están libres y disponibles para inhibir post-transcripcionalmente aquellos ARNm diana que contengan motivos CA. Pero en medios pobres, fase estacionaria o baja temperatura (10 °C), los niveles de CrcZ y CrcY aumentan, secuestrando a Hfq y Crc y liberando así la represión catabólica.

2.2.1. La proteína reguladora Crc

La proteína Crc (del inglés *Catabolite repression control*) fue descrita originalmente como una proteína relacionada con la represión de ciertos compuestos cuando *P. aeruginosa* crece en presencia de succinato (Wolff et al., 1991), siendo, por tanto, el primer elemento relacionado con la represión catabólica de *Pseudomonas*. La proteína Crc está presente en todas las especies del género *Pseudomonas* que se han analizado (Rojo, 2010), así como en algunas bacterias próximamente emparentadas, como en *Azotobacter vinelandii* (Quiroz-Rocha et al., 2017), aunque no siempre se encuentra bien anotada.

Al analizar la proteína Crc de *P. aeruginosa* por cristalografía, se ha visto que es una proteína globular formada por 11 láminas β internas rodeadas por hélices α (Wei et al., 2013; Milojevic et al., 2013). Crc fue inicialmente descrita como una nucleasa, pues su secuencia

muestra un 24% de identidad y un 43% de similitud con la exonucleasa III de *E. coli* K12; sin embargo, cuando se mutaron los residuos de Crc D220 y H246 que se corresponden con residuos críticos para la actividad de la exonucleasa ExoIII, se obtuvieron variantes activas de la proteína, lo cual indica que Crc no tiene actividad nucleasa (Ruíz-Manzano, 2005). La similitud entre la proteína Crc y diferentes nucleasas sugería que Crc era capaz de unirse a ácidos nucleicos, hecho que se demostró al comprobar que Crc puede unirse a algunos ARNm (Moreno et al., 2007; Moreno et al., 2015); aunque, como veremos a continuación, no lo hace por sí sola.

En los primeros trabajos realizados con Crc purificada, ésta se obtenía a partir de cepas de *E. coli* sobreproductoras, y las preparaciones resultantes eran capaces de unirse a ARNs diana que llevasen el motivo CA; por lo que se propuso que Crc era una proteína que se une al ARN, inhibiendo su traducción (Moreno et al., 2009b). Sin embargo, cuando se obtuvieron preparaciones de Crc con mayor pureza se observó que ésta ya no se unía a los ARNm diana, y se llegó a la conclusión de que la actividad de unión al ARN se debía a una proteína que co-purificaba junto a Crc (Milojevic et al., 2013). Pronto se averiguó que el contaminante era la proteína Hfq de *E. coli*, y que es Hfq quien reconoce inicialmente los motivos CA en el ARNm, mientras que Crc es responsable de estabilizar esta unión (Moreno et al., 2015; Sonnleitner et al., 2017b). Aunque de forma transitoria se llegó a proponer que era Hfq, y no Crc, quien ejercía el papel regulador de la represión catabólica (Sonnleitner et al., 2014), actualmente está claro que ambas proteínas cooperan tanto *in vitro* como *in vivo* en el proceso de unión al ARN y que, tras la unión inicial de Hfq al ARN, Crc se une al complejo e incrementa la estabilidad del mismo (Moreno et al., 2015; Madhushani et al., 2015; Sonnleitner et al., 2017b).

En general, la ausencia de Crc en *P. aeruginosa* y en *P. putida* conlleva el desequilibrio del metabolismo, la alteración de la captación y asimilación de fuentes de carbono, un aumento de la susceptibilidad a antibióticos y un descenso de la eficacia biológica (en inglés *fitness*) (Wolff et al., 1991; Moreno et al., 2009a; Linares et al., 2010; Hernández-Arranz et al., 2013; La Rosa et al., 2015). Se ha descrito que el mutante *crc* de *P. putida* crece un 8% más despacio en medio rico, en el que se establece una alta represión catabólica, y sólo un 2% más lentamente en medio mínimo con succinato como única fuente de carbono, donde la represión catabólica es baja (Moreno et al., 2009a; Este trabajo). Esta diferencia se debe a que en medio mínimo con succinato el papel de Crc es pequeño, y la represión catabólica que el succinato ejerce sobre otros compuestos está mediada principalmente por otros elementos, como la oxidasa terminal Cyo (Dinamarca et al., 2002; Dinamarca et al., 2003).

Además de Crc y de Hfq, de la que hablaremos en detalle en el apartado 2.2.2, se han descrito otras proteínas implicadas en el control fisiológico de *P. putida* que también pueden afectar a la selección de fuente de carbono; éstas son Cyo y las proteínas del sistema PTS^{Ntr}. La citocromo *o* ubiquinol oxidasa (Cyo) es una de las cinco oxidasas terminales de la cadena de transporte de electrones que tiene *P. putida*. Ensayos de transcriptómica realizados por Morales et al., (2006) han demostrado que Cyo, pero no las otras oxidasas terminales, afecta a la expresión alrededor de 100 genes en *P. putida*. La regulación ejercida por Cyo incluye la inhibición de la expresión de genes implicados en la degradación de ciertas fuentes de carbono

no preferentes, como los alcanos o el fenol (Petruschka et al., 2001; Dinamarca et al., 2002). El efecto de Cyo depende tanto de la disponibilidad de oxígeno, como del medio y la fuente de carbono y energía disponible. Se ha descrito que la falta de Cyo desencadena la liberación de la RC en medio LB, así como en medio mínimo con lactato y succinato, pero no en medio mínimo con citrato (Dinamarca et al., 2002). Por tanto, aunque la oxidasa terminal Cyo no forma parte del regulón de Crc, se ha visto que tiene un impacto en la utilización de determinadas fuentes de carbono, quizás monitorizando el transporte de electrones (Rojo, 2010).

En *Pseudomonas* la fructosa se transporta mediante un sistema de tipo PTS (proteínas fosfotransferasas del sistema de transporte fosfoenolpiruvato-carbohidrato), el cual no participa en el proceso de RC, mientras que la glucosa se transporta mediante un sistema diferente que no va acoplado a la fosforilación del azúcar (Velázquez et al., 2004; Cases et al., 2007). *P. putida* tiene otro sistema PTS que no está implicado en el transporte de azúcares, sino en procesos reguladores como el balance carbono/nitrógeno (Velázquez et al., 2007; Cases et al., 2007). Este sistema, llamado PTS^{Ntr}, está formado por las proteínas PtsO (o NPR), PtsP (o EI^{Ntr}) y PtsN (o EIIA^{Ntr}), implicadas en la regulación del balance carbono/nitrógeno (Velázquez et al., 2007; Cases et al., 2007). Los genes *pstN* y *ptsO* se encuentran en el mismo operón que *rpoN*, y se ha visto que la ausencia de PtsN afecta a la expresión de más de 200 genes, muchos de los cuales presentan promotores dependientes de RpoN (σ^{54}) (Cases et al., 2001a). En *P. putida* se ha visto que la influencia del sistema PTS^{Ntr} se extiende a algunos genes que son diana de la represión catabólica. Por ejemplo, PTS^{Ntr} inhibe la actividad del promotor *Pu* del plásmido pWW0, responsable de la expresión de genes implicados en la degradación de tolueno, cuando las células crecen en presencia de glucosa (Cases et al., 1999; Cases et al., 2001a). Se ha descrito que PtsO y PtsN cooperan en el control del promotor *Pu*, de tal manera que en presencia de glucosa la proteína PtsO-® fosforila a PtsN, y PtsN-® inhibe el promotor *Pu* de pWW0 (Cases et al., 2001a; Cases et al., 2001b; Aranda-Olmedo et al., 2006). Esta regulación es independiente de la regulación que Crc ejerce sobre la degradación de tolueno.

La existencia simultánea de varios mecanismos implicados en el control fisiológico de la bacteria debe entenderse desde la perspectiva de que ningún único mecanismo de respuesta es adecuado para todas las condiciones ambientales, y de esta manera la célula es capaz de reaccionar adecuadamente a un entorno cambiante.

2.2.2. La proteína de unión a ARN Hfq

La proteína Hfq (del inglés *Host factor Q β phage*) fue descrita en *Escherichia coli* en los años 60 como un factor esencial del hospedador para la replicación del bacteriófago Q β , de cuya observación deriva el nombre de la proteína (Franze de Fernandez et al., 1968). Desde entonces la relevancia de Hfq ha ido en constante aumento. En los años 90 se empezaron a describir las funciones de Hfq en la fisiología de la bacteria, y se vio que la ausencia de Hfq perjudicaba la respuesta a estrés o reducía la eficacia biológica (*fitness*), entre otros efectos (revisado en Vassilieva and Garber, 2002; Valenti-Hansen et al., 2004; Vogel and Luisi, 2011; Wagner and Romby, 2015).

Hfq es la única proteína procariota perteneciente a la superfamilia de proteínas (L)Sm (Sauer, 2013). Se trata de una proteína muy conservada presente en un gran número de bacterias, con una longitud comprendida entre 70 y 100 aminoácidos, conservándose el extremo N-terminal en todos los casos, pero no así el extremo C-terminal, que está particularmente reducido en la proteína Hfq de *E. coli* (Valentin-Hansen et al., 2004). En el caso de *P. aeruginosa* y *P. putida* Hfq está formada por 82 y 86 aminoácidos respectivamente, siendo pues una proteína relativamente pequeña con un extremo C-terminal más corto que el que se observa en otras especies bacterianas. Hfq forma hexámeros que, como es habitual en las proteínas de la familia (L)Sm, tienen una estructura tridimensional de anillo (Sauer, 2013; Nikulin et al., 2015).

Actualmente se sabe que Hfq facilita el reconocimiento entre ARN pequeños (ARNp) y ARN mensajeros (ARNm), comportándose pues como una chaperona de ARN que regula post-transcripcionalmente la traducción y estabilidad de muchos ARNm (Vogel and Luisi, 2011). La estructura en anillo de Hfq conlleva la existencia de dos regiones diferentes, una cara proximal y una cara distal, cuyas funciones han sido estudiadas en detalle. La cara proximal interacciona preferentemente con secuencias ricas en uracilos de los ARNp, mientras que el dominio distal es el encargado de unirse a los ARNm, a través de motivos ricos en adeninas, cuya secuencia AA^C/UAA^C/UAA coincide con la secuencia de los motivos CA descritos para Crc (Mikulecky et al., 2004; Sauer et al., 2012; Sauer, 2013). Recientemente en *Salmonella typhimurium* se ha descrito una tercera cara de unión de Hfq, denominada cara lateral, compuesta por seis zonas (una por monómero) de aminoácidos básicos que permiten la unión del resto del ARNp, para protegerlo de la degradación (Sauer et al., 2012). No obstante, la especialización de estas caras no se cumple en todos los casos, pues aunque algunos ARNp muestran alta especificidad por alguna de las caras del anillo Hfq, otros son capaces de unirse indistintamente a la cara distal o a la proximal (Wagner, 2013).

Se ha visto que, además de interactuar con moléculas de ARN, Hfq puede cooperar con diferentes proteínas, como el regulador Crc del que ya hemos hablado, o la ribonucleasa RNasa E. Si bien en algunos casos Hfq ayuda a estabilizar y proteger a los ARNs, en otros casos Hfq interacciona con la RNasa E y otros componentes del degradosoma, facilitando la degradación de determinados ARNm (Morita et al., 2005; Aiba, 2007; De Lay et al., 2013). Curiosamente, tanto Hfq como la RNasa E tienen preferencia por secuencias ricas en adeninas y uracilos (Kaberdin and Bläsi, 2006; Wagner, 2013).

Hay dos conceptos sobre el funcionamiento de Hfq que conviene tener en cuenta: el equilibrio monómero – hexámero, y la competición de los diferentes ARNs por unirse a Hfq. Se ha sugerido que, *in vitro* y a concentraciones de Hfq equivalentes a las fisiológicas (alrededor de 1 μ M), los hexámeros de Hfq son poco estables, y por tanto la proteína se encuentra en un equilibrio constante entre la forma monomérica y la forma hexamérica más activa; mientras que a concentraciones mayores de 2 μ M los hexámeros de Hfq tienden a formar complejos multiméricos (Panja and Woodson, 2012). Por otro lado, el amplio papel regulador de Hfq hace que haya muchos posibles ARNs capaces de unirse a ella, de manera que Hfq acostumbrará a estar saturada, es decir, unida a algún ARN; *ergo* para que un determinado ARN se una a la proteína, primero ha de disociarse la unión de Hfq con el ARN anterior, estableciéndose así un

ciclado basado en la competición entre Hfq y los diferentes ARNs (Wagner et al., 2013). Este ciclado puede ser pasivo, si simplemente depende de la constante de disociación de las diferentes moléculas implicadas; o activo (y más rápido), si también se ve influido por la concentración de los diversos ARNs (Wagner, 2013). En consecuencia, la cantidad de proteína Hfq disponible dependerá de su afinidad por los distintos ARNs a los que se pueda unir, así como de la cantidad de éstos presente en cada momento.

En *E. coli* el gen *hfq* se encuentra en un superoperón y su transcripción está dirigida por, al menos, tres promotores que aseguran el mantenimiento de altos niveles de Hfq, mientras que en *P. putida* *hfq* es un gen autónomo (Arce-Rodríguez et al., 2015). La inactivación del gen *hfq* en *P. putida* KT2440 tiene un fenotipo más acusado que la inactivación del gen *crc*, incluyendo una reducción general del rendimiento fisiológico de la célula, alterando procesos tales como el crecimiento en diversas fuentes de carbono, la resistencia a estrés oxidativo o a luz UV, la motilidad, la morfología, o los niveles de ATP y NADPH (Arce-Rodríguez et al., 2015), lo que implica un cambio fenotípico pleiotrópico muy significativo. Asimismo se ha visto que en otras bacterias como *E. coli* o *P. aeruginosa* la falta de Hfq también afecta a la virulencia, la producción de biopelículas (en inglés *biofilms*) o el *quorum sensing* (Sonnleitner et al., 2003; Sonnleitner et al., 2006).

2.2.3. La transcripción de los ARNs pequeños CrcZ y CrcY está regulada por el sistema de dos componentes CbrA/CbrB

En 2009 se describió en *P. aeruginosa* un ARN pequeño (ARNp) de 368 nucleótidos (nt), llamado CrcZ, capaz de unirse a Crc a través de los 6 motivos CA presentes en su secuencia, característica que permite a CrcZ controlar los niveles de Crc libre en la célula (Sonnleitner et al., 2009). Posteriormente se comprobó la presencia del ARNp CrcZ en otras especies de *Pseudomonas*, en algunas de las cuales además se describieron ortólogos de CrcZ, como CrcY en *P. putida* KT2440 o CrcX en *P. syringae* DC300 (Moreno et al., 2012; Filitrault et al., 2013; Gómez-Lozano et al., 2015). Mediante una búsqueda BLAST se ha comprobado que CrcY no es exclusivo de *P. putida* KT2440, pues también está presente en las estirpes de *P. putida* F1, GB-1 o W619, así como en las especies *P. entomophila*, *P. fluorescens* o *P. syringae* (Moreno et al., 2012; Filitrault et al., 2013), aunque en *P. syringae* pv. tomato DC3000 está interrumpido por una transposasa que lo inactiva (Filitrault et al., 2013). En *A. vinelandii* se ha descrito un homólogo de CrcZ así como el resto de elementos del sistema, esto es, las proteínas Hfq y Crc y el sistema de dos componentes CbrA/CbrB (Quiroz-Rocha et al., 2017).

Los niveles de CrcZ y de su homólogo CrcY varían mucho en respuesta a las fuentes de carbono presentes en el medio, la fase de crecimiento o la temperatura (Moreno et al., 2012; Fonseca et al., 2013; La Rosa et al., 2015), siendo su abundancia inversamente proporcional al efecto inhibidor de Hfq y Crc, es decir, a la fuerza de la represión catabólica. Se ha sugerido que esta relación inversa es debida a la capacidad de CrcZ y CrcY para unirse a las proteínas Hfq y Crc y secuestrarlas (Sonnleitner et al., 2009; Moreno et al., 2015; Sonnleitner et al., 2017b), sin embargo, este escenario implicaría comprometer la disponibilidad de Hfq para participar en otros procesos de regulación post-transcripcional, lo cual, dada la gran variedad

de procesos que regula Hfq, resultaría poco beneficioso para la célula, siendo éste uno de los aspectos analizados en esta tesis.

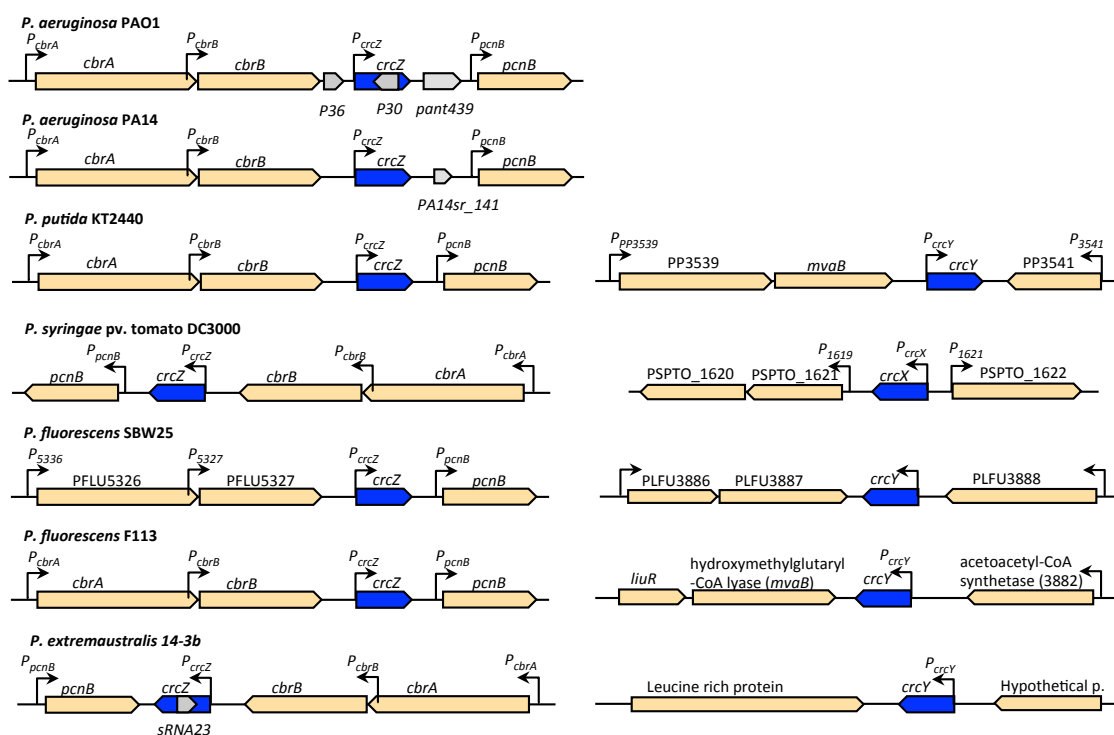


Figura 2 | Organización genómica de los ARN pequeños CrcZ, CrcY y CrcX en diferentes especies de *Pseudomonas*. El gen *crcZ* y sus homólogos *crcY* y *crcX* se indican en azul, los genes flanqueantes en naranja, y en gris otros posibles ARNp. Imagen adaptada de Gómez-Lozano et al., 2015.

a determinadas señales y que, una vez fosforilado, transfiere el grupo fosforilo a un grupo aspártico del regulador de respuesta, en este caso CbrB. Cabe señalar que CbrA es un sensor quinasa atípico, pues su dominio autoquinasa está unido mediante un conector citoplasmático con el dominio N-terminal transmembrana, que se ha sugerido puede actuar como transportador de, al menos, histidina, siendo necesaria la transducción de señal para que dicho transporte tenga lugar (Zhang et al., 2015). Aunque actualmente aún se desconoce la señal precisa que desencadena la activación de CbrA, se ha sugerido que podría responder al balance nitrógeno/carbono (Nishijyo et al. 2001; Li and Lu, 2007).

De forma semejante a como ocurre en *P. aeruginosa*, en *P. putida* KT2440 CbrB se une a la secuencia palindrómica TGTTAC-N₁₄-GTAACA, situada en las posiciones -149 a -124 y -151 a -110 respecto al inicio de transcripción de *crcZ* y *crcY*, respectivamente, y, en colaboración con la proteína IHF, activa la transcripción de los promotores *PcrcZ* y *PcrcY* (Abdou et al., 2011; García-Mauriño et al., 2013). Aunque la activación de *PcrcZ* (y *PcrcY*) depende del sistema CbrA/CbrB, se ha visto que los fenotipos de los mutantes *crcZ* (*crcZ crcY* en el caso de *P. putida*), *cbrA* y *cbrB* solapan sólo parcialmente. Los mutantes *cbrA*, *cbrB* y *crcZ* de *P. aeruginosa* no presentan motilidad tipo *swarming* y generan más *biofilm* que la estirpe silvestre (wt) (Yeung et al., 2009; Yeung et al., 2011), efectos que se ha sugerido pueden estar mediados por el ARNp CrcZ (Yeung et al., 2011; Petra et al., 2016). No obstante, en el mutante *cbrA* se han descrito fenotipos por el momento no asociados al mutante *crcZ*, tales como mayor resistencia a algunos antibióticos (polimixina, ciprofloxacina y tobramicina) o alteración de la producción de sideróforos (pioverdina y pioquelina) (Yeung et al., 2011). Las diferencias entre los fenotipos del mutante *crcZ* y los mutantes *cbrA* y/o *cbrB* se deben, en parte, a que el sistema CbrA/CbrB también regula otros genes a parte de *crcZ* (y sus homólogos *crcY* o *crcX*), como por ejemplo *lipA* (Abdou et al., 2011) o los genes de transporte de histidina (operón *hutU-hutG*) (Zhang and Rainey, 2008; Zhang et al., 2015). Además de su incapacidad para crecer en un medio con histidina como única fuente de carbono y nitrógeno (C/N), se ha visto que los mutantes *cbrAB* de *P. aeruginosa* se encuentran afectados en la utilización de arginina u ornitina como fuente de C/N, y en el uso de azúcares, lactato y piruvato como fuente de carbono (Nishijyo et al., 2001; Li and Lu, 2007), sugiriendo que algunas de estas dianas también podrían estar controladas por el sistema CbrA/CbrB. Asimismo, también se ha sugerido que en determinadas situaciones, como en condiciones de baja represión catabólica (cuando se incrementa la producción de CrcZ), el promotor *PcbrB* podría estar modulado por un regulador transcripcional aún no identificado (Yeung et al., 2011).

En *P. putida* existen dos mutantes $\Delta cbrB$ diferentes: MPO406 tiene el gen *cbrB* interrumpido por un minitransposón a partir del nucleótido 669, y MPO401 corresponde a un mutante de delección (Amador et al., 2010; Amador et al., 2016). Ambos mutantes comparten parte de su fenotipo, como el incremento de resistencia a algunos metales pesados o el descenso de motilidad tipo *swimming* y tipo *swarming*; pero curiosamente difieren en otros aspectos. Mientras que MPO401 carece de transcritos de *crcZ*, y no es capaz de crecer en presencia de histidina como única fuente de carbono y nitrógeno, MPO406 presenta una abundancia de ARN de *crcZ* similar a la de la estirpe wt, cierto crecimiento en medio con histidina, y tiene incrementada la producción de *biofilm*. Hecho especialmente interesante si

se tiene en cuenta que el mutante $\Delta crcZ$ de *P. aeruginosa* produce más cantidad de *biofilm* que la especie silvestre (Petra et al., 2016).

Se ha sugerido que las disimilitudes entre MPO401 y MPO406 son debidas a la presencia de CrcZ en una de las estirpes pero no en la otra, y a la síntesis en MPO406 de una proteína CbrB truncada que incluye el dominio receptor (dominio REC, Fig. 10) (Amador et al., 2016). El trabajo descrito en esta tesis permite arrojar más luz sobre este asunto.

Cabe señalar que si bien el mutante doble *crcZ crcY* de *P. putida* KT2440 tiene defectos de crecimiento cuando se cultiva en medio mínimo con distintas fuentes de carbono no preferentes, la inactivación individual de *crcZ* o *crcY* no afecta al crecimiento de la bacteria o a la represión catabólica. Esto es debido a que los mutantes *crcZ* o *crcY* compensan dicha mutación aumentando los niveles del otro ARNp (Moreno et al., 2012), manteniendo así una correcta regulación de la represión catabólica. Se cree, por tanto, que una de las ventajas de poseer copias homólogas a CrcZ radica en la posibilidad suplir la ausencia de un ARNp sobre-expresando el homólogo.

2.2.4. El ARN como molécula reguladora

Hace años se creía que el ADN no codificante no era relevante, pero desde la primera descripción de una molécula de ARN reguladora en 1961 hasta hoy, se ha comprobado que la riboregulación es un fenómeno muy común entre las bacterias. Las ventajas reguladoras de los ARNs son múltiples: reducen el coste metabólico, proporcionan niveles adicionales de regulación y permiten modular la expresión génica rápidamente, proporcionando a la célula una pronta adaptación a condiciones ambientales y fisiológicas cambiantes (Storz et al., 2011). El papel regulador de los ARNs es tan grande que se ha sugerido que alrededor de la mitad de los genes de *E. coli* podrían ser objeto de algún tipo de regulación mediada por ARN (Wagner, 2013). Sin embargo, la información que se tiene sobre los ARNs reguladores aún es limitada, pues muchos de ellos no han sido descritos, o lo han sido pero se desconoce cuál es su efecto en la célula. Actualmente se distinguen dos tipos de moléculas de ARN reguladoras, diferenciando entre elementos reguladores presentes en las regiones no traducidas de los ARNm, conocidos como 5'UTR o 3'UTR (del inglés *5' o 3'-untranslated region*); y los ARN pequeños (ARNp, o sRNA del inglés *small RNA*) o ARN no codificantes, moléculas de ARN menores de 500 nt que no codifican proteínas (Storz et al., 2011). Si bien algunos ARNp actúan sobre proteínas (como CrcZ y CrcY), la mayor parte lo hacen sobre otros ARNs, y en ese caso se diferencia entre *cis-encoded sRNA*, si actúan sobre un ARNm codificado en la misma zona del genoma y en la cadena complementaria a la suya; o *trans-encoded sRNA*, cuando están localizados en puntos del genoma dispares a los genes que regulan siendo, por tanto, sólo parcialmente complementarios (Storz et al., 2011). Los mecanismos mediante los que actúan los ARNp son variados; los ARNp que actúan sobre proteínas pueden modificarlas, secuestrarlas impidiendo su actividad o, por el contrario, pueden activarlas (Storz et al., 2011). Por su parte, los ARNp que interaccionan con moléculas de ARNm pueden inhibir la traducción de dichos ARNm, estimular su degradación facilitando el acceso de la RNasa E a los mismos, interferir en su transcripción, o protegerlos de la acción de las RNasas incrementando así su

vida media (Morita et al., 2005; Storz et al., 2011). En muchos de estos casos se requiere la participación de la proteína Hfq, sobre todo aquellas regulaciones mediadas por ARNp codificados en *trans* (Vogel and Luisi, 2011).

En *E. coli*, el microorganismo donde mejor se han estudiado los ARNp, se han predicho alrededor de 200 ARNp, de los que sólo se han confirmado unos 80 (Waters and Storz, 2009), entre ellos el ARN 6S (implicado en la adaptación de fase exponencial a fase estacionaria), OxyS (forma parte de la regulación del estrés oxidativo), DsrA (favorece la protección frente a bajas temperaturas), GlmZ y GlmY (relacionados con la regulación del metabolismo de la glucosa), o RyhB (regulador de la homeostasis del hierro), entre otros (revisado en Magdalani et al., 2005; Storz et al., 2011; Wagner and Romby, 2015). En el caso del género *Pseudomonas* se han descrito 680 posibles ARNp en *P. aeruginosa* y 440 en *P. putida* (Gómez-Lozano et al., 2015; Bojanovic et al., 2017). Entre los ARNp mejor estudiados se encuentran CrcZ y CrcY (Sonnleitner et al., 2009; Moreno et al., 2012), RsmZ y RsmY (Heeb et al., 2002; Valverde et al., 2003), PhrS (Sonnleitner et al., 2008), o PrrF1 y PrrF2 (Wilderman et al., 2004). De PrrF1 y PrrF2 hablaremos en profundidad en el apartado 2.3.2.

En resumen, los ARNp son elementos reguladores muy importantes, implicados en general en procesos que requieren una adaptación rápida a cambios fisiológicos o ambientales y en cuya función está muchas veces implicada la proteína Hfq.

2.3. LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO

2.3.1. La disyuntiva del hierro para la célula, su captación y regulación

El hierro es un microelemento esencial para las bacterias, pero a pesar de su importancia resulta poco accesible, ya que de las dos formas en las que se puede encontrar, ferrosa (Fe^{2+}) y férrica (Fe^{3+}), la forma oxidada Fe^{3+} , predominante en condiciones aerobias, es muy insoluble en agua (10^{-18} M), y el hierro suele estar secuestrado formando parte de sales de hierro u óxidos de hierro. En cambio, en ambientes anaerobios o microaerobios con pH bajo, es más abundante la forma soluble Fe^{2+} (revisiones recientes en Cornelis and Dingemans, 2013; Chakraborty, 2013; Lau et al., 2016). Si bien el déficit de hierro puede conllevar la muerte de la célula, pues es indispensable en muchos procesos biológicos importantes tales como la respiración, la reducción del nitrito en el ciclo del nitrógeno, la fotosíntesis o el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (revisado en Andrews et al., 2003; Massé and Arguin, 2005); el exceso de hierro también es peligroso pues puede ocasionar la formación de especies reactivas de oxígeno (especies ROS, del inglés *Reactive oxidative species*) mediante la reacción de Fenton, dañando así la maquinaria celular. Esto significa que la homeostasis del hierro está sometida a una estrecha regulación que permite a la célula mantener niveles de hierro adecuados. Esta regulación, aunque mayor en el caso del hierro, no es exclusiva de ese metal, pues otros metales como el cobre también experimentan este fenómeno de formación de radicales libres, lo que hace que ambas regulaciones puedan estar cruzadas (Teitzel et al., 2006; Cornelis et al., 2011).

- Reacción de Fenton: $\text{Fe}^{2+} + 2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}\cdot + \text{OH}^-$
- Reacción de Harber-Weiss: $\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2\cdot$
 $\text{O}_2\cdot + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{HO}\cdot + \text{OH}^-$

Para defenderse del exceso de hierro las bacterias lo acumulan en bacterioferritinas o ferritinas bacterianas, proteínas grandes formadas por hasta 24 subunidades y con hasta 12 grupos hemo, con una enorme capacidad de acumular iones de hierro, llegando incluso a acumular 4.000 átomos de hierro por proteína (Yao et al., 2011). En cambio, cuando el hierro escasea, para captarlo las bacterias secretan sideróforos, moléculas con una alta afinidad por este metal, que actúan como quelantes de hierro capaces de barrerlo del medio y facilitar su introducción en la bacteria. De entre los cuatro tipos de sideróforos descritos (de tipo hidroxicarboxilato, de tipo catecolato, de tipo hidroxamato y de tipo mixto), tanto la pioquelina como la pioverdina, los principales sideróforos de las bacterias del género *Pseudomonas*, son de tipo mixto, pues contienen un grupo catecol y un grupo hidroxamato (Fig. 3) (Krewulak and Vogel, 2008). Las pioverdinas fueron descubiertas hace 120 años, pero hasta la década de los 50 no se observó que su producción dependía de la concentración de hierro disponible en el medio (Schalk and Guillon, 2013). Hoy en día se sabe que, además de unirse a hierro, las pioverdinas también son capaces de interactuar con otros metales como, Al^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} , aunque con mucha menor afinidad (Braud et al., 2010).

P. aeruginosa es capaz de producir dos tipos de sideróforos distintos con diferente afinidad por el hierro, pioverdina y pioquelina (Schalk and Cunrath, 2016). Por su parte, *P. putida* solamente produce pioverdina, un sideróforo de alta afinidad por hierro. La pioverdina está formada por una cadena peptídica de composición variable que contiene un grupo hidroxamato de unión a hierro, una cadena lateral y un grupo cromóforo que además de contener un grupo catecol, capaz de unirse a los iones férricos, proporciona a la pioverdina su característica fluorescencia amarillo-verdosa (Fig. 3a) (Matthijs et al., 2009). Aunque sólo produce pioverdina, *P. putida* KT2440 sintetiza tres tipos de pioverdina con la misma cadena heptapeptídica, pero ciclada de manera diferente (Wei and Aristilde, 2015).

Una vez el sideróforo se ha unido al hierro presente en el medio, el ferri-sideróforo es reconocido por receptores de membrana externa que interactúan con la proteína TonB, la cual, junto con las proteínas ExbB y ExbD, transmite la energía necesaria para la internalización del sideróforo. Una vez en el periplasma, el hierro se une a proteínas periplásmicas de unión que, con la ayuda de transportadores ABC, se encargan de introducirlo al citoplasma, mientras que el sideróforo es degradado o reciclado. (Fig. 3b).

Además de los sideróforos producidos por la propia bacteria, muchas *Pseudomonas* son capaces de usar sideróforos producidos por otras bacterias, conocidos como xenosideróforos (Cornelis y Dingenmans, 2013). De esta manera, el número de receptores de sideróforos varía muchísimo entre diferentes especies bacterianas; se ha estimado que *E. coli* solamente tiene 7 receptores de sideróforos (McHugh et al., 2003; Chakraborty, 2013), número que se incrementa hasta 32 en el caso de *P. aeruginosa* (Llamas et al., 2006). *P. putida* KT2440 contiene alrededor de 25 - 29 receptores de sideróforos, que le permiten utilizar otros

sideróforos producidos por diferentes microorganismos, tales como aerobactina, ferrioxamina, ferricromo, etc. (Cornelis and Matthijs, 2002; Martínez-Bueno et al., 2002).

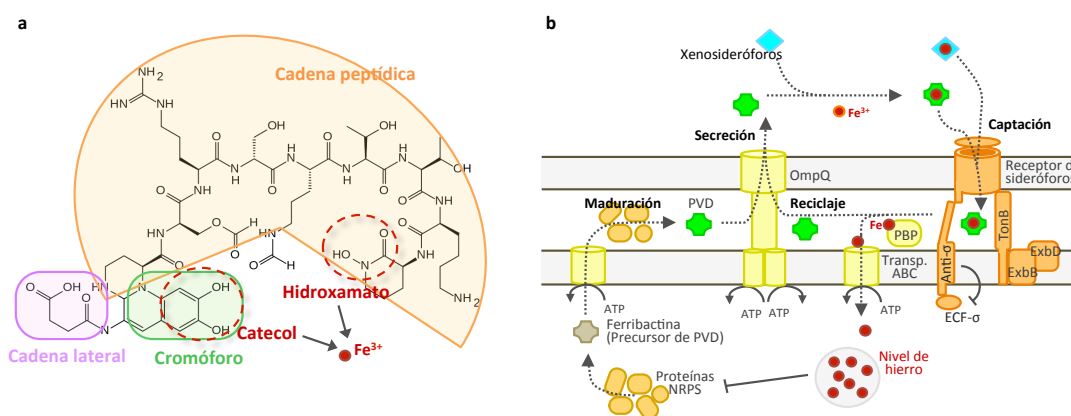


Figura 3 | Estructura, producción y captación de pioverdina en las bacterias del género *Pseudomonas*. **(a)** Estructura de una molécula de PVD, compuesta por un cromóforo (en verde), la cadena lateral (en malva) y la cadena peptídica (en naranja). En rojo se indican los grupos catecol y hidroxamato que se unen con los iones férricos. **(b)** En el citoplasma varias sintetazas de péptidos no ribosomales (proteínas NRPS) sintetizan el precursor de pioverdina, ferribactina, que madura en el periplasma dando lugar a la forma final de pioverdina, la cual es secretada al medio externo por medio del transportador PvdTR-OmpQ. Una vez en el medio externo, la PVD unida a hierro es reconocida por receptores de sideróforos dependientes del complejo TonB e internalizada, para, una vez en el periplasma, ser secretada de nuevo al medio, al tiempo que el hierro es introducido en el citoplasma. Cuando la cantidad de hierro intracelular es alta, se reprime la producción de pioverdina.

Sin embargo, la obtención de hierro que realizan las bacterias no es exclusiva de hierro férrico. Las bacterias, especialmente aquellas que son patógenas, también presentan mecanismos especializados en la captación de grupos hemo, pues en los hospedadores el hierro rara vez está libre, encontrándose principalmente formando parte de los grupos hemo. En el ser humano, por ejemplo, se calcula que el 70 % del hierro se encuentra formando parte de grupos hemo (Runyen-Janecky, 2013). Los mecanismos de captación de hemo varían según la bacteria, en *P. aeruginosa* se han descrito dos sistemas diferentes, el sistema Has y el sistema Phu. En el primer caso el mecanismo es similar al que ya hemos descrito para los sideróforos: la bacteria produce un hemóforo, una molécula cuya gran afinidad por el grupo hemo le permite secuestrarlo de otras proteínas. Cuando el hemóforo se une al grupo hemo es reconocido por HasR, un receptor de membrana específico, dependiente de TonB (Ochsner et al., 2000; Cornelis and Dingemans, 2013). Por su parte el receptor PhuR, también dependiente de TonB, es capaz de reconocer directamente a las hemoproteínas y extraer de ellas el grupo hemo, que será internalizado (Ochsner et al., 2000; Cornelis and Dingemans, 2013). En *P. putida* no se han descrito sistemas de captación de hemo, pero podría tener un sistema similar al sistema Phu, pues su genoma contiene genes homólogos a los genes del sistema Phu de *P. aeruginosa*.

Aunque no es el caso de *P. putida*, en otras bacterias como *E. coli* y *P. aeruginosa* se ha descrito un sistema, denominado sistema Feo, capaz de introducir hierro ferroso soluble mediante la permeasa FeoB y las proteínas FeoA y FeoC (Cornelis and Dingemans, 2013; Lau et al., 2016).

La gran diversidad de mecanismos que las bacterias utilizan para captar hierro da una idea de lo importante que este metal es para la célula.

2.3.2. La homeostasis del hierro está regulada por la proteína Fur y por los ARN pequeños PrrF1 Y PrrF2

El control del hierro es crucial para la bacteria, a fin de mantener hierro suficiente para mantener sus funciones celulares y evitar una acumulación excesiva que pueda ocasionar daños celulares mediante la producción de especies ROS.

La proteína Fur (del inglés *Ferric uptake regulator*) es una proteína conservada en muchas bacterias Gram positivas y Gram negativas que actúa como regulador central de la homeostasis del hierro. En condiciones de abundancia de hierro, el dímero de Fur se une al metal y sufre cambios conformacionales en su dominio N-terminal que le permiten interactuar con determinadas secuencias de ADN, denominadas cajas Fur, presentes en los promotores de algunos genes relacionados con la captación de hierro, y de esta manera, impedir el acceso de la ARN polimerasa y reprimir la transcripción de dichos genes (revisiones recientes en Cornelis, 2010; Cornelis et al., 2011; Llamas et al., 2014).

En *P. aeruginosa* el gen *fur* se transcribe desde dos promotores, uno de ellos de tipo σ^{70} , que aseguran altos niveles de la proteína, habiéndose calculado que en *P. aeruginosa* hay del orden de 10.000 - 40.000 copias de Fur, valores mayores que los de otros reguladores globales (Vasil and Ochsner, 1999), lo que sugiere que en *P. aeruginosa* Fur regula a un alto número de genes. La concentración de proteína Fur calculada para *E. coli* y *Vibrio cholerae* es menor que la propuesta para *P. aeruginosa*, aproximadamente unas 5.000 – 2.500 copias, respectivamente (Zheng et al., 1999), y curiosamente, si bien sí existen mutantes *fur* de *E. coli* (Zheng et al., 1999) y *V. cholerae* (Mey et al., 2005), se ha sugerido que *fur* es un gen esencial para *P. aeruginosa* y *P. putida* (Massé and Arguin, 2005). La secuencia consenso de la caja Fur en *P. aeruginosa*, 5'-GATAATGATAATCATTATC-3', puede ser interpretada como un palíndromo invertido de GATAATGATA, o como una repetición triple del hexámero NAT^A/TAT (Escolar et al., 1999).

El regulón de Fur es muy amplio, además de incluir a los genes a los que regula directamente, también incluye a aquellos genes que regula indirectamente gracias al control que ejerce sobre la expresión de los factores sigma extracelulares (ECF- σ) y los ANRp PrrF1 y PrrF2. Los diversos factores ECF- σ permiten la transcripción de determinados genes, como por ejemplo los genes que codifican receptores de sideróforos dependientes de TonB o los genes de biosíntesis de PVD (Cornelis, 2009). Los factores anti-sigma (anti- σ) se llaman así porque

regulan la actividad de los factores ECF- σ , al unirse a ellos e impedir su actividad (Fig. 3); sin embargo, en determinadas condiciones el estado conformacional del factor anti- σ cambia y el factor ECF- σ queda disponible para ejercer su función (Llamas et al., 2014). Los genes que codifican los factores ECF- σ y los factores anti- σ suelen transcribirse juntos, y sus zonas promotoras contienen cajas Fur, de manera que se expresan en condiciones de baja concentración de hierro, cuando Fur no es activo. Además, estos genes generalmente están localizadas adyacentes al gen que codifica el receptor de sideróforo que regulan (Martínez-Bueno et al., 2002; Llamas and Bitter, 2010).

Por su parte, los ARNp PrrF1 y PrrF2 (homólogos del ARN de *E. coli* RyhB), que también contienen cajas Fur en sus secuencias promotoras, inhiben post-transcripcionalmente genes que codifican proteínas no esenciales que usan hierro como cofactor, como por ejemplo la superóxido dismutasa SodB, las bacterioferritinas, o algunos enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos (Wilderman et al., 2004; Massé and Arguin, 2005; Chaneyre and Mandin, 2018). En *P. aeruginosa* los genes *prfF1* y *prfF2* se sitúan en tándem (Wilderman et al., 2004), disposición que permite la síntesis de PrrH, un tercer ARNp encargado de regular la captación de hemo, cuya síntesis se origina en el promotor *PprfF1* e incluye la región intergénica de *prfF1* y *prfF2* (Reinhart et al., 2015).

Así pues, la regulación del hierro mediada por Fur y los ARNp PrrF1 y PrrF2 afecta tanto a genes relacionados con el metabolismo del hierro como a genes implicados en el metabolismo energético de la bacteria, reforzando la idea de la gran repercusión que este microelemento tiene para la bacteria.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido profundizar en el conocimiento de la regulación fisiológica de *Pseudomonas putida*, en concreto en el proceso de regulación global llamado represión catabólica. Para ello se ha estudiado tanto el papel de las proteínas reguladoras Hfq y Crc, como la regulación de los ARN pequeños CrcZ y CrcY, que inhiben la acción de dichas proteínas.

Los objetivos específicos que se plantearon fueron:

- ❖ Profundizar en el estudio de la regulación transcripcional de los ARN pequeños CrcZ y CrcY, y en la posible presencia de promotores diferentes a *PcrcZ* y *PcrcY* desde los que puedan transcribirse estos ARN pequeños.
- ❖ Estudiar por calorimetría de titulación isotérmica (ITC) la formación *in vitro* del complejo tripartito Hfq/ARN/Crc.
- ❖ Comparar los regulones de las proteínas Hfq y Crc, en condiciones de baja represión catabólica, y definir nuevas funciones reguladoras que dichas proteínas puedan ejercer de forma conjunta o individual.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CEPAS Y PLÁSMIDOS

Las estirpes de *E. coli* y de *P. putida* empleadas en el desarrollo de esta tesis doctoral se enumeran en la tabla 1, junto con una breve descripción de las mismas. La construcción de las cepas originales de este trabajo se describe en detalle en el apartado 4.4.3. Por su parte, los plásmidos empleados están descritos en la tabla 2.

Los oligonucleótidos utilizados para manipulaciones genéticas están indicados en la tabla 3, mientras que aquellos oligonucleótidos empleados para ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) están detallados en la tabla 4.

Tabla 1 | Cepas de *E. coli* y *P. putida* empleadas.

Cepa	Descripción ^a	Referencia o fuente
<i>E. coli</i>		
DH5α	Cepa empleada en manipulaciones genéticas. <i>F⁻ λ⁻ endA1 hsdR17 (r_k-m_k⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169 Φ80lacZΔM15.</i>	Hanahan y Meselson, 1983; Grant et al., 1990
TOP10	Cepa empleada en manipulaciones genéticas. <i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139, Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen
NEB 5-α	Cepa empleada en manipulaciones genéticas. Derivada de DH5α. <i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 poa glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17.</i>	Biolabs
HB101	Cepa híbrida de <i>E. coli</i> K12 y <i>E. coli</i> B. Usada como hospedador de pRK2013. <i>F⁻ λ⁻ recA13 hsdR20(r_B⁻ m_B⁻) leuB6(Am) araC14 Δ(gpt-proA)62 lacY1 galK2(Oc) xylA-5 mtl-1 glnX44(AS) rspL20(Sm^R) thiE1</i>	Boyer and Roulland-Dussoix, 1969
CC118 λ-pir	Cepa empleada para la transformación de vectores no replicativos. <i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1, lysogenic λpir</i>	Herrero et al., 1990
<i>P. putida</i>		
KT2440	Cepa silvestre derivada de mt-2 pero sin pWW0. <i>mt-2 hsdR1 hsdM+</i>	Bagdasarian et al., 1981
KT2440-FR	Cepa KT2440 con una delección espontánea de los genes PP2225 a PP2259. <i>ΔPP2225-59</i>	Este trabajo
KT2442	Cepa resistente a rifampicina derivada de KT2440. <i>mt-2 hsdR1 (r⁻ m⁺) Rf^R</i>	Franklin et al., 1981

<i>KT2440Δhfq</i>	KT2440; <i>Δhfq</i>	Arce-Rodríguez et al., 2015
KTVc	KT2440; <i>crc::Gm</i>	Este trabajo
KTCRC	KT2440-FR; <i>crc::tet</i>	Hernández-Arranz et al., 2013
KTHC	KT2440; <i>Δhfq; crc::Gm</i>	Este trabajo
KT2440-Z	KT2440-FR; <i>crcZ::Tc</i>	Moreno et al., 2012
KT2440-ZY	KT2440-FR; <i>crcZ::Tc, crcY::Gm</i>	La Rosa et al., 2015
<i>ihf</i>	KT2442; <i>ihfA::Km</i>	Calb et al., 1996
MPO401	KT2442, <i>cbrB::Km</i>	García-Mauriño et al., 2013
KTb1	KT2440-FR; <i>cbrB2(Am) cbrB3(Am)</i>	Este trabajo
KTb1CRC	KT2442; <i>cbrB2(Am) cbrB3(Am) crc(p.139_141)del</i>	Este trabajo
KTb340	KT2440-FR; <i>cbrB341(Am) cbrB342(Am)</i>	Este trabajo
<i>ΔrpoN</i>	KT2442; <i>rpoN::Ωkm</i>	Köhler et al., 1989

Tabla 2 | Plásmidos utilizados.

Plásmidos	Descripción ^a	Referencia o fuente
pGEM-T Easy	Ap ^R ; vector para clonar fragmentos de ADN.	Promega
pCR4-TOPO	Ap ^R Km ^R ; vector para clonar fragmentos de ADN <i>ori(pUC) Plac lacZα-ccd</i>	Thermo Fhiser
pRK2013	Km ^R ; vector auxiliar en conjugaciones tripartitas <i>oriV(ColE1) RK2(trfA trfB)</i>	Figurski and Helinski, 1979
pSEVA225	Km ^R ; plásmido de expresión pSEVA para fusiones transcripcionales a <i>lacZ</i> . <i>oriV(RK2) lacZα-pUC19</i>	Martínez-García et al., 2015b
pSEVA225-T	Km ^R ; plásmido de expresión pSEVA para fusiones traduccionales a <i>lacZ</i> . <i>oriV(RK2) lacZα-pUC19</i>	Martínez-García et al., 2015b
pSEVA421	Sm ^R /Sp ^R ; plásmido de expresión pSEVA <i>oriV(RK2)</i>	Martínez-García et al., 2015b
pMP220	Tc ^R ; vector para fusiones transcripcionales al gen reportero <i>lacZ</i> .	Spaink et al., 1987
pEMG	Km ^R ; <i>oriV(RK6)</i> plásmido suicida con dianas I-SceI flanqueando el polilinker <i>lacZα</i>	Martínez-García and de Lorenzo, 2011

pSW-1 ^b	Ap ^R ; plásmido para expresión intracelular de la nucleasa I-SceI inducible por 3-metil benzoato. <i>oriV(RK2) xylS Pm→I-sceI</i>	Wong and Mekalanos, 2000
pSPT18	Ap ^R ; vector para clonar fragmentos de ADN bajo el control de un promotor T7 o SP6, dependiente de una ARNpol.	Sigma-Aldrich
pUC19	Ap ^R , plásmido de alto número de copias para clonar fragmentos de ADN bajo el control del promotor <i>Plac</i> ; replicón ColE1	Yanisch-Perron et al., 1985.
pCRC10Gm	Sm ^R Gm ^R ; derivados de pNKG101 con el alelo <i>P. putida crc::aacC1</i> clonado.	Moreno et al., 2007
pEMG-CbrB340	Km ^R ; derivado de pEMG con el fragmento <i>cbrB1</i> clonado.	Este trabajo
pEMG-CbrB1	Km ^R ; derivado de pEMG con el fragmento <i>cbrB340</i> clonado.	Este trabajo
pHFQ	Sm ^R /Sp ^R ; derivado de pSEVA421 con un fragmento clonado que incluye el gen <i>hfq</i> y su promotor <i>P_{hfq}</i> .	Este trabajo
pPcbrBfw1rv7	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcbrBfw1rv7-lacZ</i> . A este plásmido también se le llama pPcbrB.	Hernández-Arranz et al., 2016
pPcbrBfw2rv7	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcbrBfw2rv7-lacZ</i> .	Hernández-Arranz et al., 2016
pPcbrBfw3rv7	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcbrBfw3rv7-lacZ</i> .	Hernández-Arranz et al., 2016
pPcbrBfw4rv7	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcbrBfw4rv7-lacZ</i> .	Hernández-Arranz et al., 2016
pPcbrBfw5rv7	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcbrBfw5rv7-lacZ</i> .	Hernández-Arranz et al., 2016
pPcbrBfw6rv7	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcbrBfw6rv7-lacZ</i> .	Hernández-Arranz et al., 2016
pPcbrBfw7rv7	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcbrBfw6rv7-lacZ</i> .	Hernández-Arranz et al., 2016
pPcbrBfw1rv1	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcbrBfw1rv1-lacZ</i> .	Este trabajo
pPcbrBfw1rv2	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcbrBfw1rv2-lacZ</i> .	Este trabajo
pPcbrBfw1rv8	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcbrBfw1rv8-lacZ</i> .	Este trabajo
pPcbrBfw1rv9	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcbrBfw1rv9-lacZ</i> .	Este trabajo
pPcbrBfw1rv11	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcbrBfw1rv11-lacZ</i> .	Este trabajo
pPcbrBfw1rv12	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcbrBfw1rv12-lacZ</i> .	Este trabajo
pPcbrBfw1rv13	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcbrBfw1rv13-lacZ</i> .	Este trabajo
pPcbrB*1	Tc ^R ; derivado de pPcbrBfw1rv7 con la mutación <i>cbrB1</i> . Porta la fusión <i>PcbrB*1-lacZ</i> .	Este trabajo
pPcbrB*340	Tc ^R ; derivado de pPcbrBfw1rv7 con la mutación <i>cbrB340</i> . Porta la fusión <i>PcbrB*340-lacZ</i> .	Este trabajo
pPcrcZ	Tc ^R ; derivado de pMP220 con la fusión <i>PcrcZ-lacZ</i> .	Fonseca et al., 2013

pPrrF1	Km ^R ; derivado de pSEVA225 con la fusión <i>PprfF1-lacZ</i> .	Este trabajo
pPrrF2	Km ^R ; derivado de pSEVA225 con la fusión <i>PprfF2B-lacZ</i> .	Este trabajo
pPexbB	Km ^R ; derivado de pSEVA225T con la fusión <i>PexbB'-lacZ</i> .	Este trabajo
pPdctM	Km ^R ; derivado de pSEVA225T con la fusión <i>PdctM'-lacZ</i> .	Este trabajo
pPdctP	Km ^R ; derivado de pSEVA225T con la fusión <i>PdctP'-lacZ</i> .	Este trabajo
pSPT18-PrrF1	Ap ^R ; derivado de pSPT18 donde se ha clonado una región de 86 bp para la sonda de PrrF1.	Este trabajo
pSPT18-PrrF2	Ap ^R ; derivado de pSPT18 donde se ha clonado una región de 105 bp para la sonda de PrrF2.	Este trabajo
pSPT18-5S	Ap ^R ; derivado de pSPT18 donde se ha clonado una región correspondiente al ARN 5S.	Hernández-Arranz et al., 2016
pSPT18-Z	Ap ^R ; derivado de pSPT18 donde se ha clonado una región correspondiente al ARN CrcZ.	Hernández-Arranz et al., 2016

^a Los marcadores utilizados como antibióticos son Ap, ampicilina; Gm, gentamicina; Km, kanamicina; Sm, estreptomicina; Sp, espectinomicina; Rf, rifampicina; Tc, tetraciclina.

^b Este plásmido es el mismo que pSW(I-SceI) (Wong and Mekalanos, 2000), renombrado como pSW-1 para simplificarlo.

Tabla 3 | Oligonucleótidos utilizados en procesos de manipulación génica.

Oligonucleótido	Secuencia 5' – 3'	Uso
CbrB-aa340stop-dir	TTTTGAATTCTTGGTGGAG	Construcción del mutante KTB340.
CbrB-aa340stop-rev	AAAAATCTAGATTATTCGCT	
cbrBaa1-dirA2	AAGGACCAGGGAATTCTGATGTGGAA	Construcción del mutante KTB1.
cbrBaa1-dirC	TGAATCAATGTAGTAGATTCTGATCGT	
cbrBaa1-revB2	CGACGATCAGAATCTACTACATTGATTCAAT	
crc Down-Rv	ACCCTTTTATCGACGCCCA	Comprobación de la mutación <i>crc</i> por PCR
crc Up-fw	TCTTGCTATCGACGATGGC	
CrcZ-revPE	GTTTTTATTGTGCGTGAGCCG	Primer extension de <i>crcZ</i>
HfqComp-fw	GAACAGGAATTCGTTGACGAGGTCC	Construcción del plásmido pHFQ
HfqComp-rv	CGCTCAAAGCTTAATGCAGGCTCCT	
hfq Down-Rv	TGATGCCTTGTCACCGT	Comprobación de la mutación <i>hfq</i> por PCR
hfq Up-fw	AATCTGTCCCGCACCTT	
GeneRacer 5'	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	5' RACE

PP3868 dir	TGACTTGGCGGGCTAC	Comprobación por PCR de la escisión del profago 1.
PP3868 rev	CCAACACCCGTTCCGCC	
PP3919 dir	AAGAGCTGGTGGCGAT	
PP3920 rev	GGGCGATTTCCCTGTT	
PP3849 dir	AACCTGGTATTAAGTG	
PP3850 rev	AATCGTTATCTAGGCT	
PcbrBEcoFw1	TCACCACGAAATCCCCGGGCGAAGGAA	Construcción de la batería de fusiones <i>PcbrB-lacZ</i> y <i>cbrB-lacZ</i> .
PcbrBEcoFw2	TTGAGCGGAATTCGTACCAGGTCAGCGA	
PcbrBEcoFw3	ACATCGCGAATTCCTTCGACCACGACGA	
PcbrBEcoFw4	TCCAGGGGAATTCGGGCACCGGTAAAGA	
PcbrBEcoFw5	CTGCAGGAATTCGAGATACGCCGGGTA	
PcbrBEcoFw6	AGGCCGAATTCGCCATTCGTACTACA	
PcbrBEcoFw7	GTGCTTGAATTCAGGACCACATGACC	
PcbrBXbaRV2	TCGTCGTGGTCAAGGGCTTCTAGATGTAGTC	
PcbrBXbaRV5	CAGCTGTAGTGACGAATGTCTAGATCGGCC	Construcción del mutante KTB1.
PcbrBXbaRV7	TTACGGGTCTAGAGGTGTTACCTGGGGT	Construcción de la batería de fusiones <i>PcbrB-lacZ</i>
PcbrBXbaRV8	GGTGCCACGTTGCCTCTAGATATCGG	
PcbrBXbaRV9	CAGGTCGCTCTAGATGAGGTGAAAGTG	
PcbrBXbaRV11	AGCTTGCTAGATCGGTGCCGGGCGCGCC	
PcbrBXbaRV12	AGCGCAGGCTGGCGTAACTGGTCTAGATCAGTTTT	
PcbrBXbaRV13	TCGTCTTCTAGAATCAGAATGTGCGGC	
pEMG-67lacZrev	CTTTACACTTTATGCTTCCGGC	Comprobar cointegrados de pEMG.
pEMG-74lacZdir	CAACCTGAATTCACGCGGATGAGC	
PE-PrrF1dir	ATCATTTGCGCCGCTGGGC	<i>Primer extension</i> de PrrF1 y PrrF2.
PE-PrrF1inv	GAGTCCGAACCAGGGGCTCT	
PE-PrrF2inv	GAGCGACCTAAGCTTTCAGG	
PprrF1-fw	ATGCACTGGATCCATTTAC	Construcción del plásmido pPprrF1
PprrF1-rv	AGGGGCTCTAAGCTTATCCA	
PprrF2B-fw	GCCCAGGATTCGCCA	Construcción del plásmido pPprrF2.
PprrF2-rv	AGCGACCTAAGCTTTCAGGTTAT	
PrrF1 dir EcoRI	TGAGAATTCTTATTATTATCGCAACTG	Sonda PrrF1
PrrF1 rev PstI	AACCCTGCAGAGCCTGATGAG	
PrrF2 dir EcoRI	ATTGAATTCAGTCCAAATGAT	Sonda PrrF2

PrrF2 rev PstI	AAACTGCAGATTAGCCTGATGA	
pSW-F	GGACGCTTCGCTGAAAATA	Amplificar pSW-1
pSW-R	AACGTCGTGACTGGGAAAAC	
R24	AGCGGATAACAATTTACACAGG	Secuenciación
Race5'-crcZ-Rv	GATCCAACCAGTTCAGGCGTGCTT	5' RACE de <i>crcZ</i>
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	Secuenciación
T-exbB-Eco-fw	ACATCTCTGAATTCCTAGACC	Fusión traduccional de <i>PexbB</i> .
T-exbB-Hind-rv	AAGCGAAGCTTTGAGTACG	
T-dctM-Eco-fw	AGTCGCTGAATTCGCTGCCC	Fusión traduccional de <i>PdctM</i> .
T-dctM-Hind-rv	AGAATGAAGCTTTCCATTACGC	
T-dctP-Eco-fw2	GCTTTCGAATTCGACACCGACAGC	Fusión traduccional de <i>PdctP</i> .
T-dctP-Hind-rv	AAGCAGCAAGCTTTTGAACGTC	
T7p	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciación

Tabla 4 | Cebadores utilizados en ensayos de RT-qPCR. Para el diseño de los cebadores se utilizó el programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems), manteniendo los parámetros predeterminados. Posteriormente estos oligonucleótidos fueron validados mediante RT-qPCR (ver apartado 4.5.4.1).

Gen amplificado	Secuencia 5' – 3' cebador directo	Secuencia 5' – 3' cebador reverso
<i>aceA</i> (PP4116)	CTGACACGCGAACAGCAAA	TTTCCAGCGCGGGTTTT
<i>acoC</i> (PP0553)	AGCAGGAAGGTGACGAAATCA	GCACGCCGCTGAAAGG
<i>bfrα</i> (PP0482)	CATGCGCGAATGAATGAAGT	CTATCTCGTCACGCTGCTGAAG
<i>bfrβ</i> (PP1082)	TGGTCGCGATCAACCAGTAC	TGCTTGCCGAGTTTGTTTACG
<i>bolA</i> (PP1757)	AACAACGTATCGAACAGCAACTG	TGTGCATGTGACTTTCGTTGAG
<i>cbrB</i> (PP4696)	CGCGACGACCTGCACTT	TTTTCCAGTTCACGCACGTTAC
<i>ccoN-1</i> (PP4250)	GGCTGGGTAGCGATGATCTC	ATGCGTTCTTTGCCGAACAC
<i>ccoP-1</i> (PP4253)	AAGGGCCAGAGCAACAACAC	GCGGGTTGTCGTACTCCTCTAT
<i>cioB</i> (PP4650)	GGCGTGGCCTTCGAGTT	CCTTGTCAGATGTGTCGTT
<i>copR</i> (PP5383)	GGGTGCGGACCTTGCTT	AAGATCCGCCATTTTCATGGT
<i>crc</i> (PP5292)	CCGACGTCATCTGCCTTCAG	GAAAGCTGGGTGCTCGAGTTC

<i>crcY</i>	AAAGCAGGTCAGCGCTCAAA	TCGGCTTGTCTGGTGTG
<i>crcZ</i>	ACAACCAGGCAGAGAACAACAA	CACGTTGATCTGTCGATCCAA
<i>dctM</i> (PP1167)	CGACCTGCCCAAGCTGAT	GAAGCTGGCGGCAAAGC
<i>exbD</i> (PP5307)	CGACCTCGCCGAAAACC	TCAGCAGCACCAGCATCAC
<i>fecR</i> (PP4612)	GCAGACTTCCTTGCCGAACT	CACTGTCATCCAACGGATACGA
<i>ftsA</i> (PP1341)	CCCAGTACGCCGAAGAAATC	GCTCGGCACCTTGATGGT
<i>ftsZ</i> (PP1342)	AGTACTCCGACGTGGGTAGCA	GCATGTCCGGGTCGATCA
<i>fvpA</i> (PP4217)	CAGCGCGGCGATCTTC	CTTGCCCGAGGCTTCGT
<i>fur</i> (PP4730)	GAAAATAGCGAATTGCGCAAA	CGAGCATCTGAAGGATCTTGACT
<i>gap-1</i> (PP1009)	TCCTGCGATTCAACCACAA	CCGTTGGCCCGGGTAT
<i>grpE</i> (PP4728)	TGATCGACAGCCTGGAAGT	GGATCTGCTTGACGTGCTCAT
<i>hfq</i> (PP4894)	AAAGGTCCCGGTATCCATTTA	TGACGGTGTTCTTCAGCAATA
<i>iscU</i> (PP0843)	CGCCACCGAGTGGATGA	TCGGCCAGTTGGGTATTCTT
<i>katA</i> (PP0481)	CTACGATCACCGCGAGGATAC	CATCGTTCATCAAACGGAACA
<i>lacZ</i> de pMP220	ATCAGGATATGTGGCGGATGA	TGATTTGTGTAGTCGGTTTATGCA
<i>lsfA</i> (PP0235)	GCCTCAAACTCGGCGATATC	ACTCGTGGAAGCGGATCTTG
<i>mreB</i> (PP0933)	GCGTGCCTTCACCTGAA	GGTCGCCAGCGATTCTT
<i>petA</i> (PP1317)	GAAATCCTTGGAATCTGAAAAA	GCTGTACCGAGGCCTTGGA
PP0272	GGCCACCGTCAACCTGATC	TGTCCCAGCTGCCATAAGTG
PP0718	GCTGCGCCTGGGCTTTA	TGCCGTTTCATGTACCCATAGC
PP1121	AGTGGTGGTGCAGAAGGAAGA	GCGCGCAGAATCGAACTC
PP2010	GGTTGGCATGAGCGTATTGG	GCGCTGCACATAGTGATGGT
PP2260	GCAATGTGTGATGGTGTATCAG	GCGAGGCGATGTTTTCTG
PP3639	GGAGGTGATTCTGGGCGTAA	GCGTCTGGGCGAAAACATT
PP3797	CGATCCTGTCTGACAACCAT	CTCCTCACGGGCGATCAC
PP3804	CGTTGATCTGGCGTGATG	CTCGACAATGCGGATATTGCT
<i>pvdD</i> (PP4219)	GACCTGCCGTTCTGAACAGTT	GGAACAGCGGGTTTTGGTT
<i>pvdE</i> (PP4216)	TACCGATGTTCTGGTGATCCT	CGAGCGGGCAACGAACT
<i>pvdS</i> (PP4244)	AAGGCCAGCTGAGCTACCT	CTGCTTGCATAGTGGTCGAT

<i>pvdY</i> (PP4245)	CATTGCGACAAGGAGTTCGA	CCGCCCCAGAATCATCAA
<i>pyrE</i> (PP5291)	GTGAGGTCATGCAGATCATCAAC	GGTTCAGCGCGATCAGTACA
<i>rarD-2</i> (PP3436)	GTGCAACTGTGGCTGTTTCTCT	CAGGAAGTAACCCATCGACACTT
<i>rpoN</i> (PP0952)	TCGACCCGGAGCTGGATA	CGGCTCGAACTGCTGGAT
<i>sodA</i> (PP0946)	TTGATGCCCAGACAATGGAA	GGCATTGAGGCCGTTTAC
<i>sodB</i> (PP0915)	CTGCCGTACGCCCATGAT	GTGGTGATACTCCAGGGTTTCC
<i>ssuD</i> (PP0238)	ATTACGACGGTAAGCACATCCA	GGGCGTGGTTGCTGAATC
<i>tauB</i> (PP0232)	GAGCAAATGCAAGAGCTGCTATT	TGTCGTGGGTAATCAGGAACAC
<i>tauD</i> (PP0230)	CTGCACATCCACCCGATTTA	CCGTGTCGAGCACAAGCA
<i>tetA</i> de pMP220	CTGCGCGATCTGGTTCACT	GCATACAGCGCCAGCAGAA
<i>yegQ</i> (PP2206)	GCGGTTACACCGAAGGTTTC	CGCGCTGGTAGTTCTGGTACTC
<i>zipA</i> (PP4275)	TGCGCGAGTGGCTGATC	GCCAGCCGTCGAAAAGAAT

4.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

A lo largo de esta tesis se han usado dos medios de cultivo: LB (del inglés *Lysogeny broth*; triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) (Sambrook and Russell, 2001) como medio rico de alta represión catabólica, y medio mínimo de sales M9 (Bauchop and Elsdén, 1960) suplementado con elementos traza (Bauchop and Elsdén 1960), como medio de media o baja represión catabólica. El medio mínimo se suplementó con diferentes fuentes de carbono según el caso: citrato 30 mM (MMCit), fumarato 30 mM (MMFum), glucosa 30 mM (MMGlc), sacarosa 30 mM (MMSuc), succinato 30 mM (MMScC) o tirosina 5 mM (MMTyr). Así mismo, se utilizó una variante de MMScC sin hierro, denominado “MMlowFe”, a partir de unos elementos traza modificados en los que el Fe_2SO_4 fue sustituido por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a la misma concentración. Donde se indica, el medio MMlowFe se suplementó con FeCl_3 a la concentración deseada.

Los cultivos fueron incubados a 30 °C en el caso de *P. putida* y a 37 °C en el caso de *E. coli*, con alta aireación y agitación constante de 200 – 250 rpm. En el caso de los medios sólidos se añadió agar a 15 g/L, reduciendo su concentración a 3 g/L para las placas de motilidad tipo *swimming* (ver apartado 4.6.3).

Los antibióticos utilizados en los diferentes experimentos fueron: ampicilina (100 µg/mL), estreptomicina (50 µg/mL), gentamicina (30 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL) y tetraciclina (8 µg/mL). A excepción de cuando fue necesario añadir antibiótico para mantener

el plásmido, los experimentos se realizaron en ausencia de antibiótico, debido a las alteraciones fisiológicas que estos pueden producir en la célula.

4.3. TÉCNICAS DE ADN

4.3.1. Extracción y purificación de ADN cromosómico y plasmídico

Para la extracción de ADN cromosómico se usó el kit comercial *G-NOME® DNA kit* (MP Biomedicals), mientras que la purificación de ADN plasmídico se realizó con el kit comercial QIAprep® (Quiagen). Por su parte, la purificación de fragmentos de ADN provenientes de reacciones de PCR o de digestiones enzimáticas se llevó a cabo con el kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). En todos los casos se siguieron las indicaciones del proveedor.

4.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de fragmentos de ADN se empleó de forma rutinaria el kit PCR Master Mix (Promega), y de forma puntual la polimerasas *Pfu DNA Polymerase* (Promega) o *Long Expand Template PCR System* (Roche). Las condiciones de amplificación generales empleadas consistieron en un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos de amplificación con 30 s de desnaturalización, 30 s de hibridación a la temperatura de hibridación más adecuada según el par de cebadores empleado, y un paso de elongación a 72 °C de 1 min por cada kilobase (kb) amplificada; finalizando con un paso de elongación extra de 7 min a 72 °C. En aquellos casos en los que se utilizó *Pfu* ADN polimerasa en lugar de Taq pol, la temperatura de elongación se redujo a 68 °C.

4.3.3. Otras técnicas generales

Las digestiones se realizaron con los enzimas indicados en cada caso, usando el tampón más apropiado según las indicaciones del proveedor (BioLabs). En cuanto a las ligaciones, éstas se realizaron con la *DNA ligasa de T4* (BioLabs), siguiendo igualmente las recomendaciones del fabricante.

La concentración de ácidos nucleicos, ya fuera ADN o ARN, se midió mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS) utilizando un espectrofotómetro Nanodrop™ 1000 (Thermo Scientific).

4.4. MANIPULACIONES GENÉTICAS

4.4.1. Transformación de ADN en *E. coli*

4.4.1.1. Producción de células competentes mediante el método de RbCl

Las células competentes *E. coli* DH5 α se obtuvieron mediante el protocolo de RbCl (Sambrook and Russell, 2001). Partiendo de un cultivo de células crecidas en medio LB hasta fase exponencial (A_{600} 0,5), se centrifugaron a 4 °C y se lavaron una primera vez en solución TFB-I (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, KAc 30 mM, CaCl₂ 10 mM y glicerol 15 %) a 4 °C, para posteriormente centrifugar nuevamente las células y resuspenderlas en TFB-II (RbCl 10 mM, MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol 15 %) a 4 °C. Estas células pueden ser usadas en el momento o bien conservarse a -80 °C.

Cuando se necesitó una mayor eficiencia de transformación se utilizaron las células competentes comerciales *E. coli* NEB 5- α o *E. coli* One Shot TOP10, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

4.4.1.2. Transformación por choque térmico

La transformación de ADN en *E. coli* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Sambrook and Russel (2001). Las células competentes arriba descritas fueron incubadas en contacto con el plásmido 30 min en hielo y, tras un choque térmico de 45 s a 42 °C, volvieron a incubarse en hielo, esta vez 5 min. Posteriormente se les añadió 1 mL de medio LB y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Finalmente los transformantes fueron seleccionados mediante siembra en placas de medio LB con el antibiótico de selección adecuado en cada caso.

4.4.2. Transformación de ADN en *P. putida*

4.4.2.1. Transformación por electroporación

La preparación de células electrocompetentes de *P. putida* se basa en el protocolo descrito por Sambrook and Russell (2001). De forma resumida, partimos de un cultivo de células crecidas en medio LB hasta fase exponencial (0,5 – 0,6 A_{600}) que se recogen por centrifugación, se lavan dos veces con 1/2 volumen de agua Mili-Q a 4 °C, y posteriormente se realiza un tercer lavado con un volumen 1/14 de glicerol 10% a 4 °C. Estas células se conservaron a -80 °C en alícuotas de unos 150 μ l.

Las electroporaciones se llevaron a cabo usando cubetas *Gene Pulser® Cuvette 0,2 cm electrode gap* (BioRad) y el programa Ec-2 del electroporador MicroPulser™, también de BioRad.

4.4.2.2. Transformación por conjugación

En otros casos, los plásmidos se introdujeron en *P. putida* mediante una conjugación tripartita, haciendo uso de filtros de conjugación y el plásmido auxiliar pRK2013 (De Lorenzo and Timmis, 1994) como donador de las funciones de transferencia.

De forma resumida el protocolo es el siguiente: se centrifuga un volumen pequeño de cultivos O/N de las tres cepas implicadas, esto es, la cepa donadora *E. coli*, la cepa auxiliar *E. coli* pRK2013 y la cepa receptora *P. putida*, y se resuspende en medio LB nuevo. Luego se ponen en contacto las tres cepas en proporción 1:3:5 y se pasa la mezcla por un filtro de conjugación (0,45 µM, Millipore), el cual se deja incubar unas 6 a 8 h sobre una placa de LB. Tras ese tiempo se resuspenden las células del filtro en MMCit, se hacen diluciones seriadas y se siembran en placas de MMCit con el antibiótico de selección. La fuente de carbono es importante, pues en estas condiciones *E. coli* no puede crecer y sólo lo hará *P. putida*, pero únicamente la *P. putida* transformada, gracias a la presión de selección ejercida por el antibiótico.

4.4.3. Obtención de estirpes mutantes de *P. putida*

4.4.3.1. Inactivación del gen *crc* de *P. putida* en la cepa parental KT2440 y en la estirpe mutante *hfq*

En la colección de cepas del laboratorio ya existía un mutante *P. putida* *crc::aacC1* (Hernández-Arranz et al., 2013), construido sobre el fondo genético KT2440-FR. Para generar una estirpe mutante en *crc* a partir de la cepa KT2440, dicho gen fue inactivado mediante recombinación homóloga usando el plásmido suicida pCR10Gm como donador (Moreno et al., 2007). Se comprobaron varios clones mediante PCR, eligiendo aquél que en vez de portar el gen *crc* silvestre contenía el alelo *crc::aacC1*. Esta estirpe fue denominada KTVc.

El mismo procedimiento se realizó sobre el mutante *P. putida* KT2440Δ*hfq* (Arce-Rodríguez et al., 2015) para la obtención del mutante doble *hfq* *crc*, denotado como *P. putida* KTHC.

4.4.3.2. Complementación del mutante *hfq* con el plásmido pHFQ

El mutante KT2440Δ*hfq* del que disponemos nos fue cedido por Víctor de Lorenzo (Arce-Rodríguez et al., 2015). Para complementar este mutante amplificamos una región de 669 bp que incluye tanto el gen *hfq* como su promotor *Phfq*, usando los oligonucleótidos hfqComp-fw y hfqComp-rv y el cromosoma de KT2440 como molde. Este fragmento fue introducido en el plásmido pSEVA421, originando el plásmido pHFQ, el cual se transformó en el mutante KT2440Δ*hfq* mediante electroporación, dando origen a la estirpe KT2440Δ*hfq* (pHFQ).

4.4.3.3. Construcción del mutante ámbar del gen *cbrB*, KTB340

Se querían los niveles de transcripción del ARNp CrcZ procedentes del transcrito *cbrB-crcZ*, para lo que era preciso inactivar el promotor *PcrcZ* pero manteniendo la actividad del promotor *PcbrB*, así como la secuencia del transcrito *cbrB-crcZ*. La estrategia seguida fue la construcción de mutantes traduccionales de *cbrB*, es decir, mutantes que transcriben el gen *cbrB* con normalidad pero en los que la traducción del ARNm termina de forma prematura. Esto se logró introduciendo codones de stop, en concreto codones TAG que causan una mutación denominada “ámbar”, en la secuencia del gen *cbrB* mediante el sistema de edición de genoma Sce-I descrito por Martínez-García and de Lorenzo (2011).

Se construyeron dos mutantes de estas características. El primero, denominado KTB340, es capaz de traducir los primeros 340 aminoácidos de la proteína, lo que implica que produce una proteína CbrB trunca (CbrB*) que contiene el dominio N-terminal REC (donde se localiza el residuo fosforilable de la proteína) y la mayoría del dominio ATPasa, pero le falta el final del dominio ATPasa y el dominio C- terminal HTH de unión al ADN (denominado dominio HTH por sus siglas en inglés, *Helix-turn-helix*). Por ende, la proteína CbrB* no sería capaz de actuar como factor de transcripción en la activación del promotor *PcrcZ*.

Para la construcción de KTB340 se partió de una secuencia de ADN (sintetizada químicamente por la empresa Life Technologies) de 751 bp, correspondiente a la última mitad del gen *cbrB*, pero donde los codones 341 y 342 habían sido sustituidos por dos codones de stop TAG. Este fragmento de ADN fue amplificado con los oligonucleótidos CbrB-aa340stop-dir y CbrB-aa340stop-rev y clonado en el plásmido pEMG usando los enzimas de restricción EcoRI y XbaI, de manera que la secuencia quedó flanqueada por dianas Sce-I. Dado que el plásmido pEMG replica en *E. coli* pero no en *Pseudomonas*, tras transformar mediante electroporación *P. putida* KT2440 con el plásmido pEMG-CbrB340, se seleccionaron colonias resistentes al antibiótico, en las que el plásmido se había insertado en el cromosoma (Fig. 4a). Luego se comprobó la identidad de los supuestos clones cointegrados mediante PCR, usando por un lado los cebadores aa340dir y pEMG-74lacZdir, y por otro lado los cebadores pEMG-67lacZrev y aa340rev (Fig. 4b). Una vez comprobado, se transformó el cointegrado KTcbrB-cbrB340, de nuevo mediante electroporación, con el plásmido pSW-1, que expresa la endonucleasa Sce-I bajo el control del promotor Pm, inducible por 3-metil benzoato (3MB). Al inducir la endonucleasa Sce-I con 5 mM de 3MB, ésta produce una rotura de doble cadena del ADN que concluye con una recombinación homóloga forzada y sus consecuentes clones pueden ser de tipo silvestre o de tipo mutante portando la mutación *cbrB340*.

Tras secuenciar y comprobar la identidad del mutante KTB340, lo único que restaba era curarlo del plásmido pSW1 mediante pases en medio LB, comprobando periódicamente si los clones resultantes eran Ap^R o Ap^S. Una vez obtuvimos un clon KTB340 Ap^S se comprobó que realmente no tuviera el plásmido pSW-1 mediante PCR, usando los cebadores pSW-F y pSW-R; y la mutación *cbrB340* mediante secuenciación.

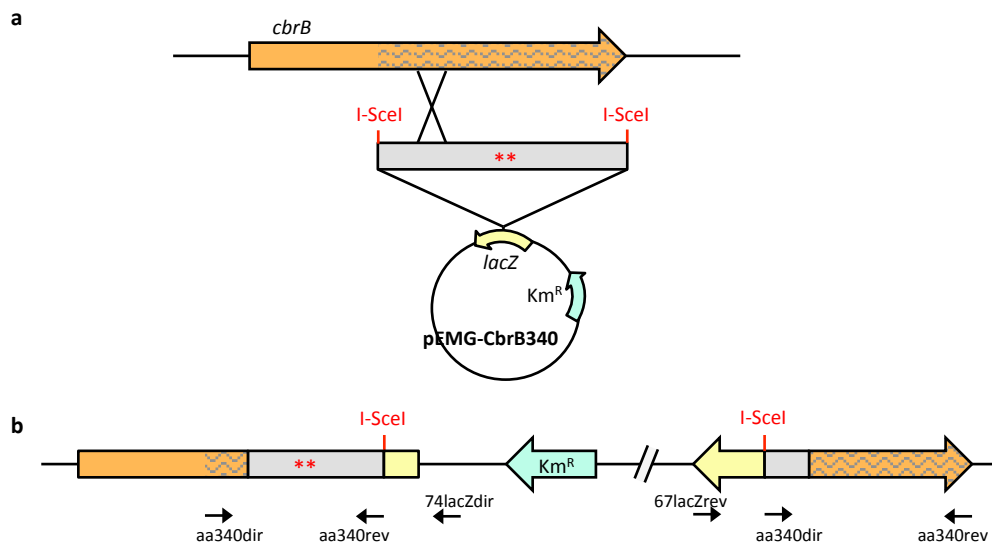


Figura 4 | Esquema de la recombinação e integración de pEMG-cbrB340 en el cromosoma de *P. putida*. **(a)** Esquema de la recombinação homóloga entre el gen *cbrB* (en naranja) del cromosoma con la porción clonada en pEMG-CbrB340 (en gris) que porta las mutaciones ámbar, representadas con asteriscos en la figura. **(b)** Un ejemplo de clon cointegrado indicando los lugares donde hibrida los oligonucleótidos aa340dir, aa340rev, 74lacZdir y 67lacZrev usados para la comprobación por PCR.

4.4.3.4. Construcción del mutante ámbar del gen *cbrB*, KTB1

En el caso del mutante KTB1, que contiene dos codones de stop en las posiciones 2 y 3 del gen *cbrB*, y que por tanto sólo sintetiza el primer aminoácido de la proteína, seguimos un procedimiento muy similar al anterior pero con un punto de partida diferente. En este caso, debido a las características de secuencia de la zona, no era posible la síntesis química de la región de ADN, así que se llevó a cabo un proceso de mutagénesis dirigida mediante PCR solapante (SOE-PCR, del inglés *Splicing overlap extension PCR*) descrito por Heckman and Pease (2007).

El sistema se basa en la amplificación de las regiones flanqueantes al lugar de la mutación introduciendo el cambio de interés en los oligonucleótidos B y C (Fig. 5a). Los productos de PCR obtenidos, productos AB y CD, sirven de ADN molde para el siguiente paso de amplificación (Fig. 5b), en el cual se obtendrá el producto AD, esto es, la región completa con la mutación deseada ya introducida (Fig. 5c). Luego se clona el producto AD en el plásmido pEMG mediante los enzimas de restricción EcoRI y XbaI originando el plásmido pEMG-CbrB1. A partir de aquí se continúa el proceso de forma semejante al protocolo descrito para el mutante KTB340 en el apartado 4.4.3.2, pero utilizando el plásmido pEMG-CbrB1.

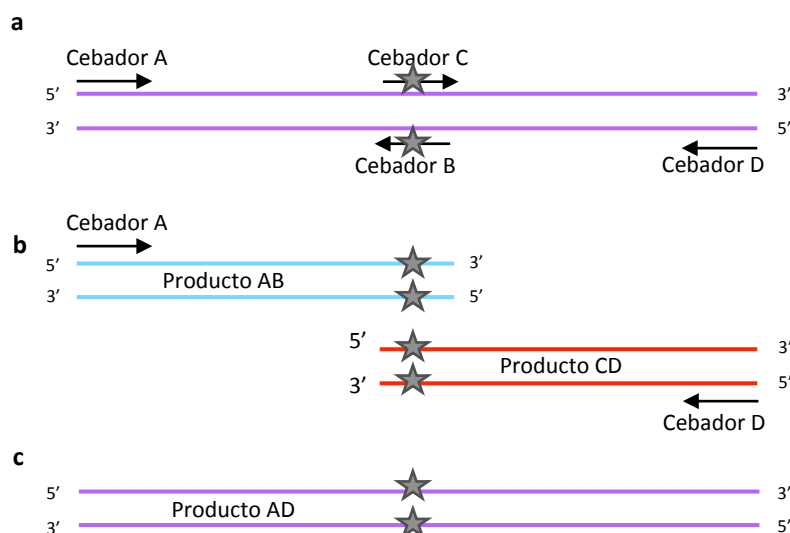


Figura 5 | Esquema del proceso SOE-PCR para la incorporación de una mutación puntual (indicada en la imagen con una estrella). **(a)** La mutación se incorpora en la secuencia de los cebadores C y B (en nuestro caso *cbrBaa1-dirC* y *cbrBaa1-revB2* respectivamente), los cuales son usados para amplificar las zonas flanqueantes a la mutación junto con los otros cebadores A y D (en nuestro caso *cbrBaa1-dirA2* y *PcbrBXbaRV5* respectivamente) que hibridan a aproximadamente 600 bp de distancia. **(b)** Los productos de PCR obtenidos, productos AB y CD, se usan como ADN molde en una nueva amplificación con los cebadores de los extremos (cebadores A y D). **(c)** Se obtiene un producto AD con la mutación puntual incorporada en la secuencia.

4.4.3.5. Construcción de los plásmidos pPcbrB

Para estudiar la posible presencia de un promotor interno en el gen *cbrB*, así como el efecto de esta región sobre la actividad del promotor *PcbrB*, se construyó una colección de fusiones *PcbrB-lacZ* de variada longitud y secuencia. Primeramente se construyó la fusión *PcbrBfw1rv7-lacZ*, clonando en el plásmido pMP220 una región de 1,7 kb que engloba el promotor *PcbrB*, todo el gen *cbrB* y unas pb después del potencial terminador de la transcripción; para lo cual se usó el par de oligonucleótidos *PcbrBEcoFw1* y *PcbrBXbaRV7*, que contienen dianas para los enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*, respectivamente. Una vez clonado el fragmento, se verificó su secuencia mediante secuenciación.

A continuación se construyeron una serie de fusiones cada vez más cortas en sentido 5' → 3' amplificando el ADN con el mismo oligonucleótido reverso (*PcbrBXbaRV7*) pero sustituyendo el oligonucleótido directo en cada ocasión: *PcbrBfwEcoRI*, *PcbrBEcoFw2*, *PcbrBEcoFw3*, *PcbrBEcoFw4*, *PcbrBEcoFw5*, *PcbrBEcoFw6* y *PcbrBEcoFw7*.

Además se construyeron dos fusiones derivadas de la fusión más larga de todas, *PcbrBfw1rv7-lacZ*, que portan las mutaciones *cbrB1* y *cbrB340*. Para ello, se rehizo dicha construcción con los mismos oligonucleótidos, pero usando como molde ADN cromosómico de los mutantes KTB1 y KTB340, generando así las fusiones *PcbrB*1-lacZ* y *PcbrB*340-lacZ*.

Se repitió el proceso manteniendo el cebador directo (PcbrBEcoFw1) pero cambiando el cebador reverso utilizado para la amplificación del ADN, de manera que las fusiones resultantes se acortaban en sentido 3' → 5'. Los cebadores reversos utilizados fueron PcbrBXbaRV2, PcbrBXbaRV8, PcbrBXbaRV9, PcbrBXbaRV10, PcbrBXbaRV11, PcbrBXbaRV12 y PcbrBXbaRV13.

Todos los oligonucleótidos utilizados, así como los plásmidos obtenidos, están detallados en las Tablas 2 y 3.

4.4.3.6. Construcción de los plásmidos pPrrF1 y pPrrF2

Para estudiar el nivel de expresión de los ARNp PrrF1 y PrrF2 en función del medio y de la cantidad de hierro disponible en el mismo, así como el efecto que tienen las proteínas Hfq y Crc, se construyeron fusiones de los promotores *PprfF1* y *PprfF2* al gen reportero *lacZ*.

Como punto de partida para la construcción de las fusiones *pPprfF1-lacZ* y *pPprfF2-lacZ* se empleó la información aportada por el trabajo de D'Arrigo et al. (2016), un análisis transcripcional global de *P. putida* KT2440 en el que se propone que *prfF1* y *prfF2* estarían localizados como sigue:

- El gen *prfF1* se encontraría después de PP4685 en sentido 5' → 3', y su transcrito tendría un tamaño de 92 pb.
- Y el gen *prfF2* se localizaría tras el gen PP4069, en sentido 5' → 3', y produciría un transcrito mayor, de 144 bp.

Considerando esos inicios de transcripción, se amplificaron las posibles regiones promotoras para PrrF1 y PrrF2 usando los pares de oligonucleótidos PrrF1-dir y PrrF1-rev, y PrrF2-dir y PrrF2B-rev, y se clonaron en el plásmido pSEVA225 usando los enzimas de restricción BamHI e HindIII. Las fusiones resultantes *PprfF1-lacZ* y *PprfF2-lacZ* fueron comprobadas por secuenciación, y posteriormente transformadas mediante electroporación en las estirpes KT2440, KTVc, KT2440 Δ hfq y KTHC.

4.4.3.7. Construcción de los plásmidos pPexbB, pPdctM y pPdtcP

Se quiso comparar el efecto que las proteínas Hfq y Crc tienen sobre la regulación post-transcripcional de los genes *exbB*, *dctM* y *dctP*. Para ello se amplificó la región promotora de los tres genes con pares de cebadores específicos (descritos en la tabla 3) que incluían dianas para los enzimas de restricción EcoRI e HindIII, y posteriormente se clonaron en el plásmido pSEVA225T, asegurándonos de incluir la región RBS y de mantener la pauta de lectura. Los plásmidos resultantes fueron comprobados por secuenciación.

Posteriormente estos plásmidos fueron transformados mediante electroporación o conjugación tripartita en las cepas KT2440, KTVc, KT2440 Δ hfq y KTHC; los fondos génicos donde se va a estudiar su actividad.

4.5. TÉCNICAS DE ARN

4.5.1. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se ha usado de forma rutinaria el kit *RNeasy® Mini Kit* (Quiagen), incluyendo un tratamiento de DNasa en columna (*DNase I recombinant, RNase-free*, Roche). Dado que las extracciones hechas con este sistema tienden a enriquecer la muestra con ARNs mayores de 200 bp, cuando fue necesario asegurar la presencia de ARNs pequeños en la muestra se realizó una extracción con fenol:cloroformo usando el kit *Trizol® Max™ Bacterial Isolation Kit* (Ambion). En ambos casos se siguieron las indicaciones del proveedor.

Tras la extracción se comprobó la integridad del ARN obtenido cargando una pequeña cantidad en un gel de electroforesis de agarosa. Así mismo, se midió la concentración de ARN obtenido mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS) utilizando un espectrofotómetro Nanodrop™ 1000 (Thermo Scientific).

4.5.2. Tratamiento del ARN purificado con DNasa I

Las muestras de ARN utilizadas en ensayos de PCR cuantitativa (RT-qPCR) requieren estar libres de cualquier rastro de ADN, por lo que fueron sometidas a un segundo tratamiento con DNasa I (*Turbo DNA-free™*, Ambion), siguiendo las indicaciones del fabricante para tratamientos de muestras con alta concentración. Tras este tratamiento se comprobó que las muestras realmente estuvieran libres de ADN mediante un ensayo de RT-qPCR usando cebadores para el gen constitutivo *rpoN*, o *rpoS* en el caso de estar trabajando con muestras de *ArpoN*.

4.5.3. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó mediante retrotranscripción de 10 µg de ARN extraído con el kit *RNeasy* (Quiagen) y tratado con DNasa I (*Turbo DNA-free™*, de Ambion). Dicha retrotranscripción se llevó a cabo usando el sistema *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), y siempre de forma simultánea para todas las muestras a comparar. Brevemente, las condiciones de la reacción consistieron en un primer paso de 10 min a 25 °C para la hibridación de los oligonucleótidos, 2 h a 37 °C para la amplificación y finalmente 5 s a 85 °C para la inactivación de la polimerasa. Las muestras se conservaron a -20 °C.

4.5.4. PCR cuantitativa o PCR a tiempo real (RT-qPCR)

Las reacciones de PCR cuantitativa (RT-qPCR) se realizaron usando el ADNc obtenido tal y como se ha detallado en el apartado anterior. El ensayo se hizo empleando triplicados biológicos de cada muestra a comparar, así como triplicados técnicos de las mismas. Para realizar el ensayo de RT-qPCR se utilizaron 10 ng de ADNc de forma rutinaria, pero cuando el gen a estudiar presentaba baja expresión esta cantidad se aumentó a 100 ng.

Para la amplificación se siguieron las indicaciones previamente descritas por Morales et al. (2006), utilizando oligonucleótidos para el gen de interés (0,2 μ M) y el kit *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Los valores de amplificación fueron registrados por el aparato 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), usando los parámetros predefinidos.

4.5.4.1. Curvas estándar de validación de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems), con los parámetros predefinidos. Estos cebadores fueron validados mediante la realización de una recta patrón con diluciones seriadas de ADNc. Se consideraron adecuadas aquellas parejas de oligonucleótidos que tenían una pendiente entre -3,8 y -3,2 y por tanto una eficiencia entre el 90 % y el 105 %.

La lista de oligonucleótidos utilizados está detallada en el apartado 4.1, en la tabla 4.

4.5.4.2. Cuantificación relativa

Para la comparación de los niveles de ARN en dos condiciones distintas se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito por Livak and Schmittgen (2001). Según este método los valores de C_t (del inglés *Threshold cycle*) obtenidos se refieren a un control interno (en nuestro caso *rpoN* para las comparaciones cromosómicas y *tetA* para las plasmídicas) y posteriormente se comparan con la condición de referencia, en este caso la cepa parental. De esta manera se obtiene un ratio de cambio que será > 0 cuando hay más expresión en la muestra problema que en el control, y < 0 cuando la expresión en el control es más alta.

También es posible calcular el número de copias relativas, o $2^{-\Delta C_t}$, simplemente calculando la diferencia de C_t entre el transcrito de interés y el control interno, en nuestro caso *rpoN*. Este factor es especialmente útil cuando estamos trabajando con un número de copias muy bajo, pues pequeñas modificaciones en su abundancia provocan ratios muy elevados.

4.5.5. Determinación del inicio de transcripción.

4.5.5.1. 5' RACE

Para determinar el inicio de transcripción de *crcZ* realizamos un ensayo 5' RACE empleando el kit *Gene Racer Kit* (Life Technologies). Brevemente, a partir de un cultivo de *P. putida* crecido en medio LB hasta fase estacionaria ($2,5 A_{600}$), se extrajo el ARN total con el kit *RNeasy*[®] (Quiagen), el cual luego fue tratado con la exonucleasa TEX (del inglés, *Terminator 5'-phosphate-dependent exonuclease*), que digiere aquellos ARNm con un grupo monofosfato en su extremo 5', es decir, ARNs procesados y por ende no primarios. Ésta primera reacción enzimática, al igual que las posteriores, se concluyó mediante una extracción con fenol:cloroformo y la ulterior precipitación del ARN con etanol. Las muestras de ARN, resuspendidas en agua, fueron sometidas a un tratamiento con la pirofosfatasa TAP (en inglés *Tobacco acid pyrophosphatase*), que convierte los grupos trifosfato presentes en los extremos 5' de ARNm primarios en grupos monofosfato; ahora, el oligonucleótido *GeneRacer RNA* puede unirse a esos extremos 5' monofosfato mediante la acción de la T4 ARN ligasa. A partir de las muestras de ARN resultante se sintetizó ADNc usando cebadores aleatorios y la transcriptasa reversa SuperScript III (Life Technologies). Luego, el ADN obtenido es amplificado usando el cebador *GeneRacer 5' primer* y un cebador reverso específico para nuestro ARNm de interés, en nuestro caso el oligonucleótido Race5'-*crcZ*-Rv. A continuación el producto de PCR se clonó en el vector pCR4 y se transformó en la cepa *E. coli* TOP10 (Life Technologies). El paso final consistió en la secuenciación de 14 clones independientes a fin de determinar el inicio de transcripción del ARNm estudiado, esto es, su punto de unión con el oligonucleótido *GeneRacer RNA*.

4.5.5.2. Extensión del cebador o *Primer Extension*

Para determinar el inicio de transcripción de los ARNp PrrF1 y PrrF2 se llevó a cabo un ensayo de extensión del cebador basado en la utilización del isótopo ³²P. *P. putida* KT2440 fue crecida en MMlowFe, condición en la que la producción de PrrF1 y PrrF2 es máxima, tras lo cual se purificó el ARN total con fenol:cloroformo usando el kit *Trizol[®] MaxTM Bacterial Isolation Kit* (Ambion). Se marcaron 10 pmol de los oligonucleótidos utilizados en la extensión, PE-PrrF1inv y PE-PrrF2inv, con Y-[³²P]ATP usando el enzima PNK (del inglés, *T4 polynucleotide kinase*, New England Biolabs); tras lo cual se hibridaron 25 µg del ARN total con 2,5 pmol de cada oligonucleótido marcado, incubando la mezcla a 90 °C durante 2 min, y precipitando luego el ARN-oligo³²P con KAc 0,3 M pH 5,2 y etanol y resuspendiéndolo en agua. El paso del *primer extension* se realizó a 42 °C con 200 U de la retrotranscriptasa reversa M-MLV (Promega) siguiendo las indicaciones del proveedor. Los productos de ADNc resultantes se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 8% con urea 7 M, comparando su tamaño con una escalera de ADN generada por nosotros (ver más abajo). Una vez estuvo seco el gel (gracias al uso del Gel Dryer, de BioRad), las bandas se visualizaron mediante su exposición frente a películas para rayos X (Agfa).

El fragmento de ADN de 295 bp usado como marcador se generó amplificando ADN cromosómico de *P. putida* KT2440 con los cebadores PE-PrrF1dir y PE-PrrF1inv, el segundo de ellos previamente marcado con ^{32}P en su extremo 5'. Este ADN se trató 5 min con ácido fórmico 19M, tras lo cual se precipitó con acetato sódico 0,3 M y 3 volúmenes de etanol. El precipitado se resuspendió en 100 μl de piperidina 1 M y se incubó a 65 °C durante 30 min para romper el ADN en las posiciones formiladas (guanina y adenina), según el protocolo de secuenciación de Maxam and Gilbert (1980). Tras precipitar el ADN con acetato sódico 0,3 M y 3 volúmenes de etanol, éste se resuspendió en tampón de carga para electroforesis.

Usando esta misma metodología también se llevó a cabo un ensayo de *primer extension* para comparar los extremos 5' del transcrito CrcZ primario y el transcrito CrcZ procesado (CrcZ*). En este caso se usaron muestras de ARN correspondientes a las estirpes *P. putida* KT2442 y KT2442 Δ rpoN crecidas en medio LB hasta fase exponencial (0,6 A₆₀₀), las cuales fueron selectivamente tratadas con el enzima TEX para digerir los ARNs procesados, y se empleó el oligonucleótido CrcZ-revPE marcado con ^{32}P .

4.5.6. Northern Blot

El ARN fue extraído empleando la metodología más adecuada según el tamaño del ARNp a estudiar y, cuando fue necesario, tratado con la exonucleasa TEX (el ARN se incubó con 1 U de enzima 1 h a 30 °C) para digerir los ARNs procesados presentes en la muestra.

A continuación el ARN – 5 μg en el caso de estar trabajando con CrcZ y 2,5 μg cuando se pretendía detectar PrrF1 y PrrF2 – fue cargado en un gel de poliacrilamida al 6 % con 7 M de urea en presencia de tampón de formamida y previamente desnaturalizado a 80 °C. Una vez separadas, las muestras se transfirieron a una membrana de Nylon Hybond N⁺ (GE Healthcare) mediante electrotransferencia semiseca con el equipo Trans-Blot® SD (BioRad). Esta transferencia fue realizada a 400 mA durante 1 h. Pasado este tiempo, el ARN se fijó a la membrana mediante luz ultravioleta en un transiluminador UVC 500 Ultraviolet Crosslinker (Amersham Biosciences), siguiendo las indicaciones del fabricante.

La hibridación con la sonda se llevó a cabo en un horno de hibridación (Amersham Hybridization oven/shaker, GE Healthcare). El primer paso consistió en un periodo de incubación de 2 h a 68 °C en tampón de prehibridación (*DIG Easy Hyb*TM, Roche), tras el cual se añadió la sonda marcada con digoxigenina (ver apartado 4.5.6.1) y se incubó toda la noche (O/N) a 42 °C. Al día siguiente se lavó la membrana siguiendo el protocolo de Sambrook and Russell, 2001; esto es, primeramente se hizo un lavado a temperatura ambiente (RT) con tampón SSC 1X con SDS 0,1%, y seguidamente se realizaron tres lavados a 68 °C usando tampón SSC 0,5X con SDS 0,1%. Tras esto se reveló la membrana mediante el sistema *DIG Luminescent Detection Kit* (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bandas fueron visualizadas o bien con películas para rayos X (Agfa), o bien utilizando el ChemiDocTM (BioRad), aparato que nos permite realizar una cuantificación de las bandas obtenidas (ver apartado 4.5.6.2).

4.5.6.1. Construcción de las sondas de ARN

Las sondas para la detección de PrrF1 y PrrF2 se generaron a partir de la parte central de estos ARNp, alrededor de 100 nt. Estas zonas se amplificaron usando los oligonucleótidos correspondientes (detallados en la tabla 3) y se clonaron en el vector pSPT18, en la orientación adecuada para ser transcritos desde el promotor SP6 del plásmido. Tras comprobar los plásmidos resultantes pSPT18-PrrF1 y pSPT18-PrrF2 por secuenciación, se pasó a la generación de la sonda marcada. El plásmido, previamente linealizado con la enzima de digestión EcoRI, se usó como molde para la retrotranscripción *in vitro* con la SP6 ARNpol, siguiendo las indicaciones del sistema empleado (*DIG RNA Labeling Kit (SPE6/T7)*, Roche).

El tamaño final de las sondas construidas fue de 97 nt para PrrF1 y de 113 nt para PrrF2, correspondientes a las posiciones -17 a +80 de PrrF1 y -35 a +78 de PrrF2.

En el caso de la detección de CrcZ se utilizó el plásmido pSPT18-Z (Hernández-Arranz et al., 2016), disponible en el laboratorio, que contiene una región de aproximadamente 150 bp que hibrida con la zona central de CrcZ (la menos similar en secuencia a CrcY).

En ambos experimentos se usó el ARNr 5S (tiene un tamaño de 120 nt) como control de carga de las muestras de ARN. La sonda para el ARNr 5S se generó a partir del fragmento clonado en el plásmido pSPT18-5S (Hernández-Arranz et al., 2016).

4.5.6.2. Cuantificación

La cuantificación de las bandas se ha realizado analizando las imágenes captadas por el ChemiDoc™ (BioRad) con el programa Image Lab™ Software (BioRad). Al no haber un control preciso de la cantidad de ARN empleada para cada muestra hemos usado la banda del ARN 5S como control de carga, lo que nos ha servido como valor de normalización de las muestras. Estos experimentos fueron realizados tres veces.

4.5.7. Ensayos de retardo en gel (EMSA)

El ensayo se realizó siguiendo las indicaciones previamente descritas por Moreno et al. (2015). El ARN marcado (ver apartado 4.5.7.1) y diferentes concentraciones de las proteínas Crc y/o Hfq (purificadas como se describe en Moreno et al., 2015) se incubaron durante 20 min a RT en tampón de unión en presencia de un inhibidor de ribonucleasas (*RNasin® RNase Inhibitor*, Promega) y de un competidor inespecífico (1 µg de ARNt). Se utilizaron dos tampones de unión diferentes, el tampón HEPES+MgCl₂ (10 mM KOH pH 7,9, 35 mM KCl y 2 mM MgCl₂) y el tampón HEPES (50 mM HEPES, 250 mM NH₄Cl y glicerol 10%; pH 7), este último usado en los experimentos de ITC (ver apartado 4.8.2).

Tras la incubación se añadieron 2,5 µl de tampón de carga (60 % glicerol y 0,025 % xilencianol) y se separaron las muestras en un gel de poliacrilamida al 4 % en condiciones no

desnaturalizantes. La electroforesis se realizó a 4 °C y 150 V, usando el tampón TBM (45 mM pH 8,3 Tris-HCl, 43 mM ácido bórico, 2 mM MgCl₂ y 5 % glicerol). Una vez concluida la electroforesis los geles se secaron mediante un Gel Dryer (BioRad) y las bandas se visualizaron con ayuda de películas para rayos X (Agfa).

4.5.7.1. Síntesis y marcaje radioactivo de los ARN

Los fragmentos de ARN utilizados para los ensayos de retardo en gel fueron sintetizados químicamente por la empresa Sigma-Aldrich. La secuencia de los oligonucleótidos es la que sigue, con el dominio CA en negrita:

- *alkS*: 5'-CAUAAUGAA**AAUAAUAAU**AAUAAUG-3'
- *dmpR*: 5'-UCCCCAUCU**AAAAUAAU**AGGGGC-3'

Estos oligonucleótidos se marcaron radiactivamente en el extremo 5' con la ayuda de la enzima T4 polinucleótido quinasa (Promega), incubando 100 pmol de oligonucleótido con [γ -³²P], 30 min a 37 °C. Tras este tiempo, se inactivó la enzima por calor, y se purificó el ARN usando las columnas *Illustra MicroSpin G-25 Columns* (GE Healthcare). Los oligonucleótidos marcados se cuantificaron mediante un contador de centelleo.

4.6. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

4.6.1. Ensayo de actividad β -galactosidasa

Para ensayar la actividad de las diversas fusiones transcripcionales *PcbrB-lacZ*, *PcrcZ-lacZ*, *PprfF1-lacZ* y *PprfF2-lacZ*, se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa empleando el protocolo descrito por Miller (1972), basado en el uso del sustrato ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido). En el caso de la fusión traduccional *PexbB'-lacZ*, cuya actividad era baja, se utilizó el kit *Galacto-light PlusTM* (Thermo Fisher), un método que resulta más sensible gracias al empleo de un sustrato quimioluminiscente. Se siguieron las indicaciones del fabricante, y la señal fue analizada mediante un luminómetro (TECAN Infinite m200, Tecan Group Ltd.).

Independientemente de la metodología empleada, las células fueron reinoculadas en medio con antibiótico a 0,05 A₆₀₀, para luego ir tomando muestras y midiendo su actividad β -galactosidasa a lo largo de la curva de crecimiento. En todos los casos se realizaron tres experimentos independientes.

4.6.2. Curvas de crecimiento

De forma rutinaria las curvas de crecimiento se realizaron en un lector de microplacas (TECAN Infinite m200, Tecan Group Ltd.), que toma medidas de la turbidez (A₆₀₀) cada 10 min;

para lo cual las células, previamente lavadas, se reinoculan a 0,03 A_{600} en placas multipocillo transparentes de fondo plano (Costar).

No obstante, dado que la baja aireación que tienen los cultivos crecidos en estas condiciones lleva a que la densidad celular alcanzada sea mucho menor que la que alcanzarían en un matraz, donde hay agitación constante y mayor aireación, de forma excepcional también se hicieron curvas de crecimiento en matraces. En este caso las células, previamente lavadas, se reinocularon a 0,05 A_{600} en el medio de interés y se fue tomando medidas de la turbidez cada 30 – 60 min con la ayuda del espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu).

4.6.3. Ensayo de motilidad tipo *swimming*

Para llevar a cabo los ensayos de motilidad se prepararon placas de medio mínimo al 0,3 % de agar, con la fuente de carbono y la cantidad de hierro deseadas en cada caso. Como preinóculos se usaron clones aislados crecidos O/N en placas LB que, con la ayuda de un palillo estéril, se inocularon hasta la mitad de la placa de agar. Tras un periodo de incubación de 20 h a temperatura ambiente (RT), se midió el halo de natación (en cm) de cada estirpe y se fotografiaron las placas. Se realizaron cuatro réplicas, mostrando la media \pm SD obtenida para cada caso.

4.6.4. Visualización de pioverdina en cultivos líquidos

La determinación de la producción de pioverdina (PVD) se realizó siguiendo las indicaciones previamente descritas (Baysse et al., 2001), aprovechándonos de las propiedades fluorescentes de este sideróforo. Brevemente, las células crecidas en LB + antibiótico fueron lavadas tres veces en sales M9 sin hierro para eliminar cualquier traza del mismo que pudiera quedar en el medio, y posteriormente reinoculadas (en triplicados) a 0,03 A_{600} en placas multipocillo de paredes negras y fondo transparente (Corning). Los valores de fluorescencia (excitación 405 nm y emisión 460 nm) medidos con un lector de placas multipocillo (TECAN Infinite m200, Tecan Group Ltd.), fueron normalizados respecto a la turbidez (A_{600}).

Este experimento se realizó tanto en medio mínimo con alta cantidad de hierro (el MMScc habitual, no modificado, descrito en el apartado 4.2), como en un medio mínimo con falta de hierro (el medio MMLowFe descrito en el apartado 4.2).

4.6.5. Cuantificación de pioverdina en placas de agar

Para la detección de pioverdina en medio sólido (1,5 % de agar) se usaron placas de medio mínimo M9 con 30 mM de succinato, 84,5 μ M de hierro (medio MMScc), y concentraciones crecientes del quelante 2,2-bipiridilo (2,2-BP). Los cultivos O/N fueron lavados con sales M9 (carentes de hierro) y resuspendidas a 10^6 bacterias/mL, luego se depositaron

gotas de 10 µl de esos cultivos sobre las placas, las cuales fueron incubadas 48 h a 30 °C, periodo tras el que fueron fotografiadas con iluminación ambiental.

4.6.6. Fotografías de células con microscopio óptico

Se estudió la morfología de las células, previamente fijadas e inmovilizadas, fotografiándolas a 100 aumentos con el microscopio óptico Olympus DP70. Con este fin, se recogieron muestras de las células a lo largo de la curva de crecimiento, se fijaron con formaldehído al 0,925 %, y posteriormente se fijaron a los portaobjetos usando una fina capa de agarosa al 1 % en dH₂O.

4.7. ENSAYOS DE TRANSCRIPTÓMICA Y PROTEÓMICA

4.7.1. Análisis del transcriptoma mediante ensayo de RNA-Seq

Hemos comparado el transcriptoma de la estirpe silvestre *P. putida* KT2440 con el de los mutantes KTVC, KT2440 Δ *hfq* y KTHC en condiciones de baja represión catabólica, es decir, usando células crecidas hasta fase exponencial (0,6 A₆₀₀) en medio mínimo con succinato como única fuente de carbono (MMScc). El ARN fue purificado con el kit *RNeasy* (Quiagen) y posteriormente tratado con DNasa (*RNAse-free DNase Set*, Quiagen) para eliminar del todo el ADN residual de las muestras. La calidad de las muestras se comprobó usando el bioanalizador Aligent 2100 (Agilent Technologies, Inc., USA).

La construcción de las librerías y la secuenciación masiva fue realizada en la unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid, España. De forma resumida, se eliminó el ARNr mediante el sistema *Ribo-Zero rRNA Removal Kit* (Illumina) para muestras bacterianas y se construyeron librerías direccionales (es decir, específicas de hebra), empleando el kit *TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit* (Illumina). La secuenciación se llevó a cabo en formato de lectura de extremo único (en inglés *single end*) con el sistema *HiSeqTM 2000 Sequencing System* (Illumina). A fin de obtener una base de datos con secuencias homogéneas, se comprobó la calidad de las secuencias cortas mediante FastQC (Babraham Bioinformatics; <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>).

4.7.1.1. Análisis de los datos

El análisis inicial de los datos de secuenciación del transcriptoma se realizó en el Servicio de Bioinformática para Genómica del CNB-CSIC. Las lecturas obtenidas se alinearon respecto al genoma de *Pseudomonas putida* KT2440 (secuencia de referencia NCBI NC_002947.3) utilizando el programa Bowtie 2 (Langmead and Salzberg, 2012) con los parámetros predeterminados. De las aproximadamente 3 millones de lecturas obtenidas para cada muestra, alrededor del 96% - 99% pudieron ser alineadas con el cromosoma de *P. putida*

KT2440, siendo además la mayoría (> 92,45%) eventos de alineación única. La clasificación e indexado de los archivos de alineamiento (archivos con extensión .bam) fue realizada con el programa SAMtools (Li et al., 2009), y la asignación de las lecturas alineadas a los genes (lo que implica la cuantificación de las mismas) con la función HTSeq-count del paquete HTSeq Python (Anders et al., 2015). Para visualizar el alineamiento de las lecturas se ha utilizado el visualizador IGV (del inglés *Integrative Genomics Viewer*; Broad Institute) (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>; Robinson et al., 2011). Para analizar la variación de la expresión génica entre las diferentes muestras se empleó el *Bioconductor edgeR* (Robinson et al., 2010), con los parámetros por defecto. Dado que no se realizaron réplicas biológicas, la significancia estadística de los resultados fue calculada atribuyendo un valor de dispersión de 0,1², tal y como se recomienda en el manual de *Bioconductor edgeR*.

El ulterior filtrado de los genes que presentaban una variación significativa de la expresión génica se llevó a cabo con el visualizador FIESTA (Oliveros, 2007), empleando como parámetros de selección una confianza estadística de $FDR \leq 0,01$ y una variación de nivel (*fold-change*) de ± 3 veces ($\log_2 FC \geq |1,585|$).

Los datos crudos totales de los ensayos de RNA-Seq están disponibles en el sitio web del NCBI *Gene Expression Omnibus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), con el código de acceso GSE110803.

4.7.2. Análisis del proteoma mediante iTRAQ

El análisis del proteoma de las cepas de *P. putida* KT2440 y de los mutantes KTVC, KT2440 Δ hfq y KTHC fue realizado en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), siguiendo el siguiente esquema general.

4.7.2.1. Preparación de las muestras

Las estirpes de *P. putida* KT2440, KTVC, KT2440 Δ hfq y KTHC se incubaron en medio mínimo con succinato como única fuente de carbono (MMSCc) hasta fase exponencial (0,6 A₆₀₀), momento en que se recogieron 20 mL de cada cultivo mediante centrifugación a 4 °C. Los precipitados, resuspendidos en 2 mL de tampón de lisis (20 mM Tris, 7 M urea, 2 M tiourea, 5% (w/v) CHAPS y el inhibidor de proteasas *Protease inhibitor cocktail tablets*, de Roche), se sonicaron y posteriormente se centrifugaron a 14.000 rpm y 4 °C durante 30 min para eliminar los restos celulares.

Tras precipitar las proteínas del sobrenadante con metanol/cloroformo, siguiendo el protocolo descrito por Wessel and Flugge (1984), éstas se resuspendieron en 160 µl de tampón de resuspensión (7 M urea, 2 M tiourea, y 100 mM bromuro de tetraetilamonio). A continuación se cuantificó la cantidad de proteína en cada muestra usando el sistema comercial *RC/DC Protein Assay* (BioRad).

4.7.2.2. Etiquetado para el iTRAQ

A fin de preparar las muestras para el etiquetado se digirieron 40 µg de proteínas de cada muestra incubándolas O/N con 4 µg de tripsina (Sigma-Aldrich) a 37 °C. Una vez digeridas las muestras, los péptidos resultantes se etiquetaron durante 2 h a RT con una etiqueta iTRAQ diferente para cada estirpe, siguiendo las recomendaciones del fabricante (*iTRAQ Reagent Multi-Plex Kit*, de AB Sciex). Las muestras etiquetadas se mezclaron y desalinizaron mediante el empleo de una columna *Sep-PAK C18 Cartridge* (Waters Corporation).

Todo este proceso fue realizado por duplicado, con dos muestras de cada una de las estirpes a comparar, y siguiendo un diseño 8-plex, lo que nos permitió analizar de forma simultánea tanto los duplicados de cada estirpe como las diferentes estirpes.

4.7.2.3. Cromatografía líquida y espectrometría de masas

Para la detección de los péptidos presentes en cada muestra se realizó un ensayo de espectrometría de masas (MS, del inglés *Mass spectrometry*). Para ello, 1 µg de fracción peptídica fue analizada mediante cromatografía líquida acoplada a MS en un espectrómetro AB Sciex TRIPLE Q-TOF (de AB Sciex).

4.7.2.4. Análisis de los datos

Tanto la identificación de las proteínas como el análisis de su expresión diferencial fueron realizados por Proteobotics S.L. (España). De forma resumida, los espectros de MS/MS obtenidos se exportaron a formato *mgf* con el programa Peak View v1.2.0.3, y los péptidos se compararon, mediante el uso de los motores informáticos Mascot Server v2.5.1, OMSSA v2.1.9, X!TANDEM v2013.02.01.1 y Myrimatch v2.2.140, con las 5313 secuencias de *P. putida* KT2440 disponibles en la base de datos de Uniprot (versión de Noviembre de 2015), así como con los contaminantes más habituales. La búsqueda se realizó con un margen de error de masa de 25 ppm y un margen de error de fragmento iónico de 0,02 Da, valores con los que se es posible perder dos lugares de corte crípticos y un error isotópico máximo (^{13}C) de 1, considerando la modificación fija de la cisteína por metil-metano-tiosulfato (MMTS), la oxidación variable de la metionina, ácido piroglutámico desde glutamina o ácido glutámico del extremo N-terminal del péptido, y la modificación de la lisina y el extremo N-terminal del péptido con Tandem Mass Tags (TMT) 6-plex reactivos. Se usaron modelos de distribución de puntos para calcular los valores peptídicos de *p*-valor (Ramos-Fernández et al., 2008). Para el análisis cuantitativo se seleccionaron los valores recuperados de un filtro FDR $\leq 0,01$ (del inglés, *false discovery rate*), descartando previamente aproximadamente un 1% de las señales con menor calidad. Luego se llevó a cabo una comparación mediante el método de modelos lineales (López-Serra et al., 2014), midiendo la significancia estadística mediante el parámetro *q*-valor (FDR), y considerando como cambio de expresión significativo aquellos casos en los que la abundancia de proteína mostró un cambio $\geq \pm 1,4$ veces ($\log_2\text{FC} \geq |0,49|$) y *q*-valor $\leq 0,05$.

4.8. OTROS ENSAYOS

4.8.1. Cuantificación de la concentración de hierro mediante Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

La concentración de hierro, tanto en el interior celular como en el medio de cultivo, fue determinada mediante ICP-MS (del inglés *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), en el Servicio Interdepartamental de Investigación (Universidad Autónoma de Madrid, Spain).

Para la determinación de la concentración de hierro intracelular se recogieron, mediante centrifugación, 15 mL de células crecidas hasta fase exponencial (A_{600} 0,6) en el medio pertinente en cada caso. Los precipitados fueron disueltos en ácido nítrico al 20% y posteriormente hervidos. El contenido de hierro, determinado en mg/L, fue normalizado respecto al número de células presente en la muestra (A_{600}). Los datos mostrados corresponden a las medias resultantes de tres réplicas biológicas.

4.8.2. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

Los ensayos de ITC (del inglés *Isothermal titration calorimetry*) se llevaron a cabo en colaboración con Tino Krell, en la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), usando un microcalorímetro VP-Microcalorimeter (MicroCal, Northampton, MA, USA) a 25 °C.

Las proteínas Hfq y Crc (purificadas como se describe en Moreno et al., 2014) fueron dializadas frente a tampón HEPES (50 mM HEPES pH 7,5, 250 mM NH_4Cl y 10% glicerol), coincidente con el tampón empleado por Mikulecky et al. (2004) para calcular las constantes termodinámicas de la unión de Hfq al ARN Drsa. El oligonucleótido de ARN *alkS* utilizado (Moreno et al., 2009) fue generado por síntesis química (Sigma-Aldrich) y resuspendido en el mismo tampón, siendo su secuencia la que sigue, con el motivo CA indicado en negrita: 5'-CAUAAUGAA**AAUAAUAAUAAUAAU**AUG-3'. Las concentraciones de proteínas y del ARN fueron determinadas en un Nanodrop. Todas las soluciones fueron filtradas a través de filtros estériles de 0,22 μm y desgasadas en vacío.

Para titular las moléculas de estudio Hfq, Crc y el ARN *alkS* en el tampón, se realizaron inyecciones de 8 μl con un tiempo de espera entre las mismas de 4 min, parámetros que se mantuvieron en el resto de experimentos. Al hacer esto se comprobó que no había calores inespecíficos de dilución para 25 μM Hfq_{HEX} (considerando Hfq hexamerizada), 20 μM Crc (considerando Crc como un monómero) y 21 μM *alkS*. Tras esta comprobación, se pasó a estudiar la unión del ARN *alkS* a las proteínas Hfq y Crc, tanto de forma independiente como de forma conjunta. Primero se estudió la unión Hfq-*alkS* inyectando 20 μM de ARN en 1 μM , 2 μM y 10 μM de Hfq_{HEX} (relación 2:1, 1:1 y 1:5), siendo la concentración 2 μM Hfq_{HEX} (relación 1:1) la que permitió una correcta titulación. Posteriormente se estudió la posible unión *alkS*-Crc y Hfq-Crc inyectando 20 μM Crc en una celda que contenía 2 μM *alkS* o 2 μM Hfq_{HEX}, pero no se observó interacción en ninguno de los casos, lo que sugiere que Crc no se une por sí sola

ni a Hfq ni al ARN *alkS*. Para estudiar si la presencia de Crc mejoraba la interacción Hfq-*alkS* se siguieron dos aproximaciones. Por un lado se inyectaron 20 μM Crc en una celda que contenía 2 μM Hfq_{HEX} y 2 μM *alkS* (relación 1:1:1), para comprobar si hay interacción pasada la saturación. Por otro lado se inyectó una mezcla de 20 μM *alkS* + 2 μM Crc en una celda con 2 μM Hfq_{HEX} y 2 μM Crc (relación 1:1:1) para comprobar si la presencia de Crc en la solución afectaba a las constantes termodinámicas de la interacción proteína-ARN.

El ajuste de los datos resultantes se realizó utilizando el modelo *One binding site* del programa de análisis ORIGIN (OriginLab, Northampton, MA). De este ajuste se obtuvieron directamente los parámetros ΔH (cambio de entalpía) y K_A (constante de asociación, $K_A=1/K_D$), a partir de los cuales se calcularon los cambios de la energía libre de Gibbs (ΔG) y los cambios de entropía (ΔS), mediante la ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S$$

donde R es la constante de los gases ideales y T la temperatura absoluta.

5. RESULTADOS

5.1. PAPEL DEL ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL CbrB EN LA REGULACIÓN DE CrcZ Y CrcY. SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO DEL TRÁNSCRITO CrcZ*

Los datos de este primer capítulo están parcialmente recogidos en el siguiente artículo, incluido en los anexos de esta tesis doctoral:

Hernández-Arranz S., [Sánchez-Hevia D.L.](#), Rojo F. and Moreno R. (2016) Effect of Crc and Hfq proteins on the transcription, processing, and stability of the *Pseudomonas putida* CrcZ sRNA. *RNA*. **22**(12): 1902 – 1917

5.1.1. Análisis del transcrito CrcZ procesado (CrcZ*)

La primera parte de esta tesis se centró en profundizar en un aspecto de interés y anteriormente estudiado en nuestro laboratorio, el origen y la regulación de los ARNp CrcZ y CrcY. Tal y como se ha comentado en la introducción, los niveles de las proteínas Hfq y Crc, reguladores de la represión catabólica (RC) en *P. putida*, cambian poco en condiciones de alta y baja RC (Sonnleitner et al., 2006; Moreno et al., 2015). Sin embargo, en condiciones de baja RC aumenta mucho la síntesis de dos ARNp, CrcZ y CrcY, que antagonizan la función de Hfq y Crc, al unirse a estas proteínas e impedir que puedan acceder a los ARNm diana (Sonnleitner et al., 2009; Moreno et al., 2012; Moreno et al., 2015).

Se sabe que la transcripción desde los promotores *PcrcZ* y *PcrcY* es dependiente del factor sigma RpoN (σ^{54}) y de la proteína CbrB (Moreno et al., 2012; García-Mauriño et al., 2013), pues las fusiones transcripcionales *PcrcZ-lacZ* y *PcrcY-lacZ* no son activas en un mutante $\Delta rpoN$ (Hernández-Arranz et al., 2016 y datos no mostrados). Sin embargo, cuando mediante RT-qPCR se compara la cantidad de transcritos correspondientes a *crcZ* en la estirpe silvestre *P. putida* KT2442 y en los mutantes $\Delta rpoN$ (cepa KT2442 *rpoN::Ωkm*) y *cbrB* (cepa MPO401) se observa que, si bien en el mutante *cbrB* no se detectan estos transcritos, su cantidad en el mutante $\Delta rpoN$ es semejante a la presente en la cepa silvestre KT2442 (Hernández-Arranz et al., 2016). Esto sugiere la existencia de un promotor anterior a *PcrcZ*, independiente de RpoN, desde el que se generaría un transcrito más largo que incluiría a *crcZ*. A fin de validar esta hipótesis, se diseñaron una serie de experimentos que se detallan a continuación.

5.1.1.1. Identificación del inicio de transcripción del transcrito largo que incluye a *crcZ*

Nos planteamos la posibilidad de que en *cbrB*, el gen anterior a *crcZ*, existiera un promotor interno desde donde se sintetizase un transcrito largo que incluyese a *crcZ*. Para comprobarlo construimos una batería de fusiones transcripcionales del promotor *PcbrB* y el gen *cbrB* al gen reportero *lacZ*, conteniendo fragmentos de ADN progresivamente más cortos en dirección 5' → 3', las cuales fueron clonadas en el vector pMP220 mediante los enzimas de restricción EcoRI y XbaI. Únicamente la fusión más larga, denominada *PcbrBfw1rv7-lacZ* (abreviada como FW1 o como *PcbrB-lacZ*) contiene el promotor *PcbrB*, y llega hasta 118 nt después del codón de stop de *cbrB*, extremo 3' que se mantuvo en el resto de fusiones (Fig.

6a). La hipótesis postulaba que la fusión *PcbrBfw1rv7-lacZ* sería la más activa de todas, disminuyendo dicha actividad al desaparecer el promotor *PcbrB*, y que la actividad volvería a menguar cuando se perdiera el hipotético promotor interno de *cbrB*. Sin embargo, tanto en medio rico (medio LB, Fig. 6b) como en medio mínimo (medio MMScc, Fig. 6c), la única fusión con actividad β -galactosidasa es *PcbrBfw1rv7-lacZ*, lo que indica que no existe un promotor interno en el gen *cbrB*, al tiempo que sugiere que los transcritos originados por encima de *PcrcZ* proceden del promotor *PcbrB*.

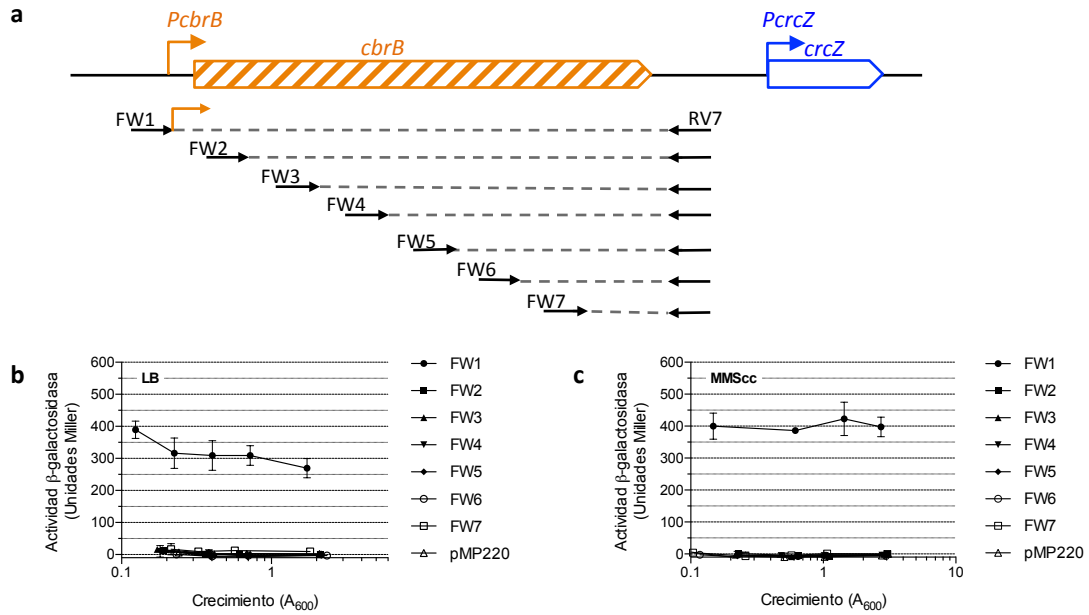


Figura 6 | Actividad β -galactosidasa de las diferentes fusiones *cbrB-lacZ*. **(a)** Representación esquemática de la porción de *cbrB* contenida en cada una de las fusiones, donde se muestra que todas ellas comparten el cebador reverso (RV7) pero tienen oligonucleótidos directos propios con las que son referidas (FW1 a FW7). Nótese que el promotor *PcbrB* solo está presente en la primera fusión, aquí referida como FW1. **(b)** Actividad β -galactosidasa de dichas fusiones en medio LB y **(c)** en medio mínimo (MMScc). Los datos corresponden a la media \pm SD de tres réplicas independientes.

Tras determinar que el transcrito largo que incluye a *crcZ* se origina en *PcbrB*, quisimos estudiar si RpoN o IHF, reguladores de los promotores tipo σ^{54} , o bien Hfq o Crc, proteínas que se sabe que afectan a los niveles de CrcZ y CrcY (García-Mauriño et al., 2013; Hernández-Arranz et al., 2016), influyen en la actividad de *PcbrB*. Para ello se ensayó la actividad β -galactosidasa de la fusión de referencia *PcbrBfw1rv7-lacZ* (abreviada como *PcbrB-lacZ*) en los mutantes *crc* (KTCRC), *hfq* (KT2440 Δ hfq), *ihf* (KT2442*ihfA::Km*) y *rpoN* (KT2442*rpoN::Ωkm*). Los datos obtenidos indican que, de entre los elementos analizados, solamente RpoN afecta a la actividad de *PcbrB*, siendo ésta tres veces más alta en el mutante *rpoN* que en la cepa silvestre (Fig. 7). A fin de corroborar el incremento transcripcional que experimenta *cbrB* en el mutante Δ *rpoN*, mediante RT-qPCR se midieron los niveles de transcrito *cbrB* en las condiciones en las que se realizó el ensayo β -galactosidasa, medio LB y fase exponencial (0,5 A_{600}), confirmando

que el transcrito *cbrB* es 2 veces más abundante en el mutante *rpoN* que en la cepa parental (datos no mostrados; Hernández-Arranz et al., 2016).

El incremento de actividad que experimenta el promotor *PcbrB* en el mutante *rpoN* puede explicar, en parte, la presencia de transcritos de *crcZ* en dicho mutante. Sin embargo, si se tiene en cuenta que la actividad del promotor *PcrcZ* es mucho mayor que la de *PcbrB* (Fig. 14), este dato parece insuficiente para justificar por sí mismo la alta cantidad de transcrito detectada en el mutante *rpoN* por RT-qPCR. (Hernández-Arranz et al., 2016).

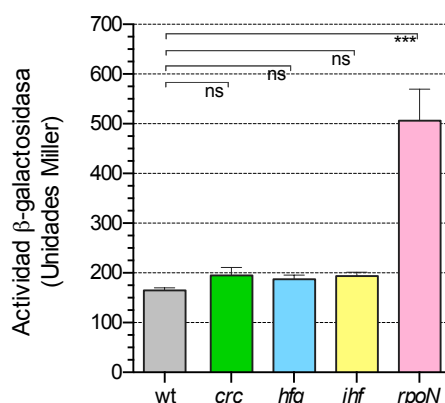


Figura 7 | Influencia de Crc, Hfq, IHF y RpoN en la actividad el promotor *PcbrB* en medio LB (0,5 A₆₀₀). Los valores corresponden a la media ± SD de tres réplicas independientes. Se calculó el valor estadístico mediante ANOVA, siendo no significativo (ns) en todos los casos excepto en el mutante *rpoN*.

5.1.1.2. Análisis del procesamiento del transcrito largo que incluye a *crcZ*

Gracias a experimentos de Northern Blot realizados anteriormente en el laboratorio, sabíamos que no era posible detectar un transcrito de casi 2 kb que incluyera a *crcZ* (el tamaño que habría de tener el transcrito largo originado desde *PcbrB*) ni en KT2442 ni en el mutante $\Delta rpoN$, siendo el tamaño del transcrito de *crcZ* detectado en el mutante $\Delta rpoN$ muy similar al detectado en la cepa silvestre (datos no mostrados). Así mismo, también contábamos con datos previos que indicaban que *crcY* podía transcribirse a partir de su promotor *PcrcY*, dependiente de CbrB, y también desde un promotor anterior que generaba un transcrito largo que se procesaba, para dar un ARNp de tamaño muy similar a CrcY (García-Mauriño et al., 2013). Esto nos llevó a pensar que el transcrito CrcZ presente en la cepa mutante $\Delta rpoN$ podría proceder de un procesamiento del transcrito generado en *PcbrB*. A fin de estudiar en detalle este posible procesamiento, se llevaron a cabo dos aproximaciones diferentes: por un lado se determinó el extremo 5' de los transcritos de CrcZ mediante un ensayo 5' RACE y mediante un ensayo de extensión del cebador (en inglés *primer extension*), y por otro lado se compararon los niveles de transcrito CrcZ primario y procesado (denotados como CrcZ y CrcZ* respectivamente) mediante un ensayo de Northern Blot.

La técnica 5' RACE permite determinar el extremo 5' de un transcrito de interés mediante la unión de un adaptador de ARN al extremo 5' de los ARNs de la muestra. En este caso se utilizaron muestras de ARN de la cepa silvestre (*P. putida* KT2442), en la que la mayoría

del ARN CrcZ es producto de la transcripción desde el promotor *PcrcZ*, y del mutante *ΔrpoN* (KT2442*rpoN::Ωkm*), en el que, al no ser activo *PcrcZ*, todo el ARN de *crcZ* presente debe provenir de *PcbrB*. El ARNp GlmY de *E. coli* puede originarse de dos promotores, uno dependiente de σ^{54} y otro de σ^{70} , con el mismo inicio de transcripción (Reichenbach et al., 2009), posibilidad que quisimos analizar enriqueciendo la muestra con transcritos primarios, para lo que el ensayo 5' RACE se combinó con el uso del enzima TEX (del inglés *Terminator 5'-phosphate-dependent Exonuclease*) que digiere los ARNs procesados pero no los primarios. Tras la mencionada ligación con el adaptador, se realizó una amplificación por PCR específica para *crcZ*, seguida de su clonaje en un vector adecuado, y de la subsiguiente secuenciación de 14 clones independientes de cada muestra de ARN (consultar el apartado 4.5.5.1 para ver más detalles). En las muestras de ARN procedentes de la cepa silvestre, el extremo 5' detectado en un mayor número de clones (64%) corresponde a un residuo adenina localizado 2 nt antes del inicio de transcripción de *PcrcZ* previamente descrito por Moreno et al. (2012) y 1 nt antes que el inicio publicado por García-Mauriño et al. (2013), ambos determinados mediante la técnica de *primer extension* (Fig. 8a). El número de clones aislados en el mutante *ΔrpoN* fue mucho menor, lo que apunta a la ausencia de transcritos primarios de *crcZ* en esta estirpe y, por ende, de otro promotor en la zona. De los clones secuenciados, la mayoría (71 %) presentan un extremo 5' localizado entre las posiciones -9 a -5, considerando el +1 determinado en este experimento para *PcrcZ* (Fig. 8a), sugiriendo la existencia de un sitio de procesamiento del transcrito *cbrB-crcZ* en esa zona, al tiempo que confirma que los tamaños de los transcritos de *crcZ* nativo y procesado (CrcZ y CrcZ*, respectivamente) son tan similares que no es posible diferenciarlos en un gel de acrilamida como los empleados en los ensayos de Northern Blot. Por otro lado, el hecho de que no se haya obtenido ningún clon que contenga el transcrito largo nativo completo puede ser debido a la procesividad de la retrotranscriptasa utilizada o, más probablemente, a que el transcrito largo experimente un rápido procesamiento en la célula. De hecho, si comparamos mediante RT-qPCR la cantidad de transcritos *cbrB* y *crcZ* presentes en la estirpe wt (*P. putida* KT2442) y en el mutante *ΔrpoN* (KT2442*rpoN::Ωkm*), se observa que, si bien en el mutante *ΔrpoN* los transcritos de *crcZ* son alrededor de 16 veces más abundantes que los transcritos de *cbrB*, en la estirpe wt la diferencia es de unas 10 veces (Hernández-Arranz et al., 2016), dato que respalda la idea de que el transcrito largo esté sufriendo un rápido procesamiento que conlleva la degradación del extremo 5' que contiene a *cbrB*, pero la estabilización y acumulación del fragmento 3' en el que se sitúa *crcZ*.

Para realizar el ensayo de *primer extension* se utilizó un cebador reverso específico de *crcZ*, previamente marcado con el isótopo radioactivo ^{32}P (ver detalles en la metodología, apartado 4.5.5.2), y muestras de ARN de la estirpe silvestre (wt, *P. putida* KT2442) y del mutante *ΔrpoN* (KT2442*rpoN::Ωkm*), que fueron tratadas, o no, con el enzima TEX de forma selectiva. Esta aproximación experimental nos permitió comparar los extremos 5', así como la abundancia relativa de los transcritos CrcZ y CrcZ* en ambas estirpes. En la muestra de ARN de la estirpe silvestre tratada con TEX se obtuvo un producto de extensión coincidente con el origen de transcripción determinado por 5' RACE (posición +1, Fig. 8a,b), producto que apenas es detectado en el mutante *ΔrpoN* (Fig. 8b). No obstante, si el ARN del mutante *ΔrpoN* no se trata con TEX se observan varios productos de extensión cuyos extremos 5' coinciden con las posiciones -6, -9, -11 y -13 (Fig. 8b), lo que concuerda, dentro de los límites de la técnica, con los resultados obtenidos en el ensayo de 5' RACE. En el caso de la estirpe silvestre también se

detectan extremos 5' localizados en las posiciones -6 a -13 cuando se analiza el ARN no tratado con TEX, pero su señal, y por tanto su abundancia en la célula, es mucho menor que en $\Delta rpoN$ (Fig. 8b), apoyando así la idea de que, aunque sí existe CrcZ* en la estirpe silvestre, su presencia es muy minoritaria, viéndose incrementada de forma significativa la cantidad de CrcZ* cuando falta RpoN en la célula.

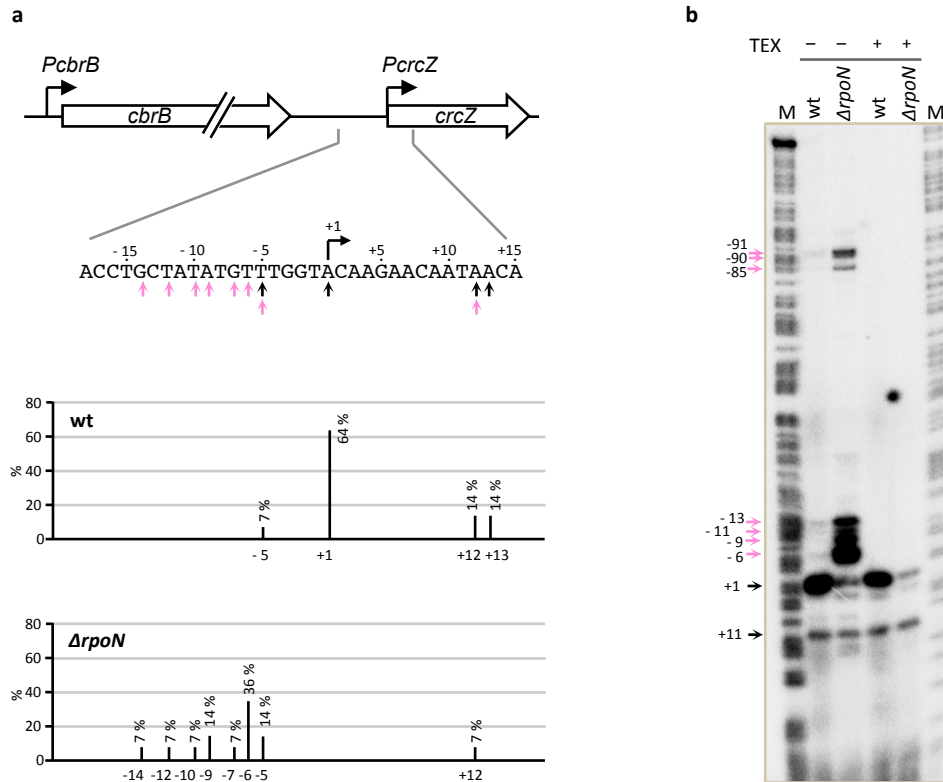


Figura 8 | Identificación del extremo 5' de los transcritos de *crcZ* presentes en la estirpe parental *P. putida* KT2442 (wt) y en el mutante KT2442*rpoN::Ωkm* ($\Delta rpoN$). **(a)** Ensayo 5' RACE usando ARN tratado con el enzima TEX. Se secuenciaron 14 clones independientes para cada estirpe, indicando con flechas negras los extremos 5' detectados en la cepa silvestre, y con flechas rosas los extremos 5' detectados en el mutante $\Delta rpoN$. En los paneles de columnas inferiores se muestra la frecuencia (%) de dichos extremos 5'. **(b)** Mediante extensión del cebador (*primer extension*) se determinaron los extremos 5' de CrcZ en muestras de ARN tratadas (+) y no tratadas (-) con TEX, a fin de comparar los transcritos primarios y procesados. Los números de la izquierda corresponden a las posiciones de los extremos 5' relativos al +1 de transcripción determinado previamente por 5' RACE. La línea M corresponde al marcador de secuencia, generado como se detalla en la metodología (apartado 4.5.5.2).

De forma complementaria se realizó un experimento de Northern Blot empleando una sonda específica para la parte central de *crcZ* y muestras de ARN de la estirpe silvestre (*P. putida* KT2442), el mutante $\Delta rpoN$ (KT2442*rpoN::Ωkm*) y el mutante $\Delta cbrB$ (MPO401), todas ellas crecidas en medio LB hasta fase exponencial (0,6 A_{600}), y usando ARN del mutante $\Delta crcZ$ (KT2440-Z) como control. Las muestras de ARN fueron tratadas de forma selectiva con el

enzima TEX que, recordemos, digiere los ARNs procesados (con un grupo monofosfato en el extremo 5') pero no los ARNs primarios (con un grupo trifosfato en el extremo 5'), facilitando la comparación de los transcritos CrcZ y CrcZ* en cada una de las estirpes analizadas.

Tal y como se ve en la figura 9 en el mutante $\Delta rpoN$ se detecta un transcrito, de tamaño muy similar al ARNp CrcZ, que hibrida con la sonda de *crcZ*, y que desaparece casi por completo cuando se trata la muestra con el enzima TEX. Esto indica que no corresponde a un transcrito primario originado en *PcrcZ*, sino a un transcrito procesado derivado de un transcrito más largo, originado en el promotor *PcbrB*. Al analizar los transcritos de *crcZ* detectados en *P. putida* KT2442 (wt) observamos que la mayoría son resistentes a TEX, *ergo* la mayoría del ARNp CrcZ presente en esta estirpe debe de originarse en el promotor *PcrcZ*. Mediante la cuantificación de tres experimentos independientes nos fue posible determinar que, tras el tratamiento con TEX, los niveles de transcrito de *crcZ* se reducen alrededor de un 20 % en la estirpe silvestre, lo que confirma la presencia de CrcZ*, aunque en mucha menor cantidad que en el mutante $\Delta rpoN$. Además, se vuelve a apreciar que los transcritos primario y procesado son de tamaño similar, coincidiendo con la presencia de un punto de procesamiento del transcrito largo cerca del inicio de transcripción de *PcrcZ*. Nótese que en el mutante $\Delta cbrB$ no se detecta CrcZ primario, puesto que en ausencia de CbrB el promotor *PcrcZ* no es activo, y tampoco CrcZ procesado (CrcZ*), pues el gen de resistencia a kanamicina que interrumpe el gen *cbrB* muy probablemente también interrumpe la transcripción desde *PcbrB*.

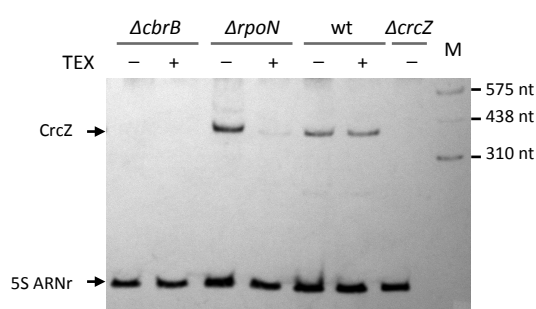


Figura 9 | Identificación por Northern Blot de los niveles de CrcZ presentes en las cepas KT2442 (wt), MPO401 ($\Delta cbrB$) y KT2442*rpoN::Ωkm* ($\Delta rpoN$), comparando los ARNs primarios (+; muestra tratada con TEX) y los procesados (-; muestra sin tratar con TEX). Como control se ha empleado la cepa KT2440-Z ($\Delta crcZ$). El ARNr 5S sirve de control interno de carga. La línea denotada como M corresponde a un marcador de peso molecular de ARN.

5.1.2. Estudio de los fenotipos generados por la ausencia de CbrB o de CrcZ*

En el apartado anterior se ha constatado que la ausencia de la proteína RpoN conlleva la inactivación de *PcrcZ*, pero no necesariamente la desaparición del transcrito de *crcZ*, puesto que desde *PcbrB* se origina un transcrito largo que da lugar a CrcZ procesado (CrcZ*). Sin embargo, la inactivación del gen *cbrB* (ya sea mediante delección o mediante interrupción con un gen de resistencia a antibiótico) no sólo conllevaría la pérdida de actividad de *PcrcZ*, sino

también la alteración de la transcripción desde *PcbrB*, provocando la desaparición del transcrito de *crcZ* tanto primario como procesado (Fig. 9). Con el propósito de estudiar el fenotipo generado por la ausencia de CbrB en un contexto genético donde sí se produzca CrcZ*, nos planteamos obtener un mutante traduccional de *cbrB*, es decir, un mutante donde estuviera afectada la traducción pero no la transcripción de *cbrB*.

5.1.2.1. Construcción de los mutantes traduccionales de *cbrB* KTB1 y KTB340

El diseño experimental seguido para la construcción de los mutantes traduccionales de *cbrB* se basó en la sustitución de determinados codones del gen *cbrB* por codones de parada TAG (codones *stop*), alterando así la traducción pero no la transcripción de *cbrB*. Este proceso de sustitución se realizó de forma independiente en dos puntos del gen *cbrB*. Por un lado se sustituyeron los nucleótidos 4 a 9 de *cbrB* (CCGCAC) por dos codones TAG consecutivos, dando lugar a una falta completa de proteína CbrB, pues sólo se incorporaría la metionina inicial, motivo por el que dicho mutante fue nombrado KTB1 (Fig. 10b). De forma independiente se reemplazaron los nucleótidos 1021 a 1026 (CAGAGC) por otros dos codones TAG consecutivos que ocasionan la interrupción de la traducción de CbrB a partir del aminoácido 340, por lo que el mutante fue denominado KTB340 (Fig. 10c).

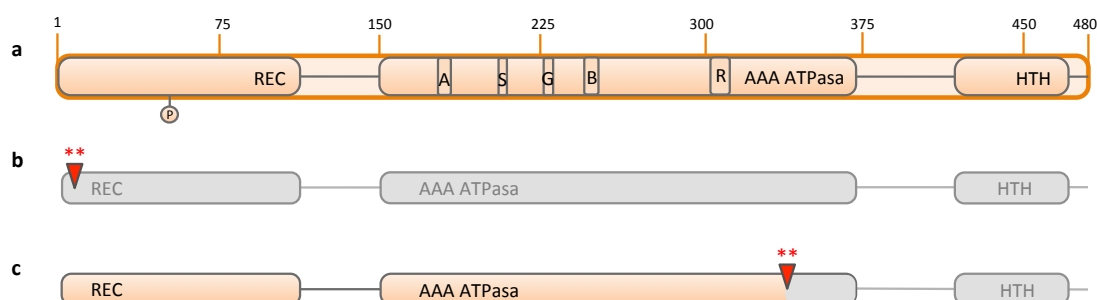


Figura 10 | Representación de los dominios de la proteína CbrB y de sus derivadas CbrB*1 y CbrB*340. **(a)** La proteína CbrB tiene un tamaño de 480 aminoácidos organizados en tres dominios diferentes. El dominio N-terminal es un dominio receptor (dominio REC) donde se halla el aminoácido aspártico fosforilable (indicado como \textcircled{P}). A continuación se encuentra el dominio ATPasa, el cual además de actividad ATPasa contiene el motivo conservado GAFTGA donde interacciona el factor σ^{54} (marcado con una G en la figura), los motivos Walker A y Walker B (A y B, motivos de unión a ATP), el motivo Switch (S, responsable de la comunicación entre las subunidades) y el motivo R-ring (R, favorece la hidrólisis de ATP). Por último se sitúa el dominio de unión al ADN (dominio HTH) (Nishijyo et al., 2001; Joly et al., 2012; Abdou et al., 2011). **(b, c)** Representación de las proteínas truncadas CbrB*1 y CbrB*340, respectivamente. Se muestra en naranja los dominios traducidos y en gris los no traducidos, indicando con una flecha roja con asteriscos el lugar donde se han introducido los codones *stop*. En el primer caso no se genera proteína alguna y en el segundo se origina una proteína truncada que contiene el primer dominio y la mayoría del segundo, conteniendo todos los motivos que han sido señalados de interés para la actividad del dominio ATPasa.

La diferencia entre los mutantes KTB1 y KTB340 radica en que, si bien el primero carece por completo de proteína CbrB, en el segundo mutante se traduce una proteína CbrB truncada (CbrB*340) que contiene el dominio receptor y casi la totalidad del dominio ATPasa, faltándole el tercer y último dominio, HTH (Fig. 10c). Desconocemos si la proteína CbrB*340 truncada es estable, o si por lo contrario es rápidamente degradada.

5.1.2.2. Efecto de las mutaciones traduccionales *cbrB1* y *cbrB340* en los niveles de los ARNp CrcZ y CrcY

Mediante RT-qPCR se midieron los niveles de transcritos de *crcZ* y *crcY* en los diferentes mutantes $\Delta cbrB$ (estirpes MPO401, KTB1 y KTB340) respecto a las estirpes silvestres *P. putida* KT2440 y KT2442, a fin de analizar el efecto de estos mutantes en la producción de transcritos procesados CrcZ* y CrcY*. El análisis se realizó a partir de células crecidas en medio MMScc hasta fase exponencial ($0,6 A_{600}$), condición donde la producción de CrcZ y CrcY es elevada (La Rosa et al., 2015). Los resultados obtenidos se compararon con datos previos que muestran que la cantidad de transcritos de *crcZ* en el mutante $\Delta rpoN$ es semejante a la detectada en la estirpe silvestre (datos no mostrados; Hernández-Arranz et al., 2016).

	<i>crcZ</i>	<i>crcY</i>	<i>cbrB</i>
KT2440 (wt)	134,7 \pm 14,8	74,7 \pm 10,3	3,9 \pm 1,6
KT2442 (wt)	142,7 \pm 24,9	67,7 \pm 23,4	3,8 \pm 1,4
MPO401	3,9 \pm 0,3	38,9 \pm 0,8	ND
KTB340	10,6 \pm 2,5	10,7 \pm 0,8	0,83 \pm 0,34
KTB1	9,25 \pm 3,15	26,5 \pm 9,9	0,05 \pm 0,01

Tabla 5 | Efecto de las diferentes mutaciones $\Delta cbrB$ sobre la abundancia de ARN de *crcZ*, *crcY* y *cbrB*. Los niveles aquí descritos corresponden al número de copias relativas de cada ARN respecto a los niveles del control interno *rpoN*, medido por RT-qPCR. Se indica como ND los genes no determinados.

Al observar los datos desglosados en la tabla 5 se aprecia que la abundancia de transcritos de *crcZ* en los mutantes *cbrB* KTB1 y KTB340 es muy baja, similar a la detectada en el mutante MPO401, lo que sugiere que en estos mutantes está afectada tanto la producción de CrcZ como la de CrcZ*. Sin embargo, los niveles de ARN de *crcY* presentes en MPO401 son mayores que los detectados en los mutantes KTB1 y KTB340, probablemente debido a algún fenómeno de compensación que aún no ha ocurrido en KTB1 y KTB340.

Estos datos no coinciden con la idea de que las mutaciones ámbar *cbrB1* y *cbrB340* estén afectando a la traducción pero no a la transcripción de *cbrB*. Por lo tanto, se comprobó cuál es la cantidad de transcrito *cbrB* presente en las diferentes estirpes analizadas. Los resultados indican que los niveles de transcrito *cbrB* están afectados tanto en el mutante KTB1 como, en menor medida, en el mutante KTB340; dejando la duda de si se debe a un defecto en la actividad de *PcbrB* o es consecuencia de una menor estabilidad de los transcritos no traducidos (Iost and Dreyfus, 1995; Kaberdin and Bläsi, 2006). Por ende, nos planteamos comprobar qué efecto tienen estas mutaciones ámbar sobre la actividad del promotor *PcbrB*, recreando las mutaciones *cbrB1* y *cbrB340* en la fusión *PcbrB-lacZ* (también llamada *PcbrBfw1rv7-lacZ*). Para ello, se usó ADN cromosómico de los mutantes KTB1 y KTB340 como ADN molde, generando así las fusiones *PcbrB*1-lacZ* y *PcbrB*340-lacZ* (Fig. 11a).

Tras alterar la secuencia del gen *cbrB* en la fusión *PcbrB-lacZ*, se obtuvo un resultado diferente para *PcbrB*1-lacZ* y para *PcbrB*340-lacZ*. Si bien *PcbrB*340-lacZ* mantiene íntegra la actividad de *PcbrB*, *PcbrB*1-lacZ* pierde prácticamente toda su actividad (Fig. 11b), indicando que la mutación *cbrB1* afecta a la actividad de *PcbrB*, mientras que la mutación *cbrB340* tiene un efecto post-transcripcional.

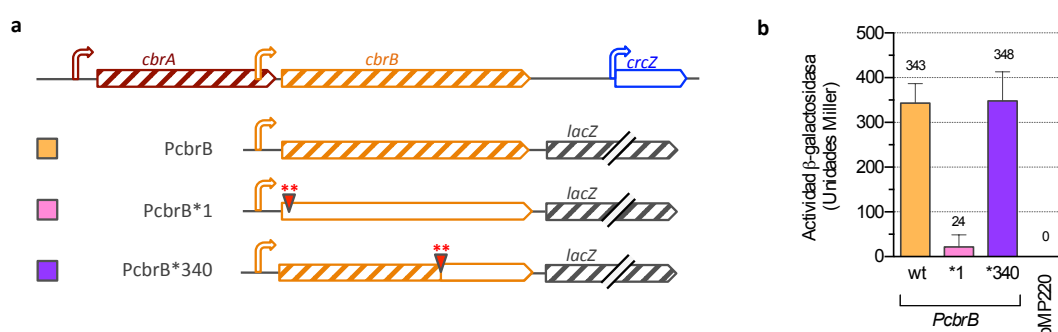


Figura 11 | Efecto de las mutaciones traduccionales *cbrB1* y *cbrB340* en la actividad de la fusión *PcbrB-lacZ*. **(a)** Representación esquemática de las diferentes fusiones *PcbrB-lacZ* ensayadas, indicando con asteriscos el lugar donde se introdujeron los codones de parada. Se representa con rayas la región de *cbrB* traducida y sin rayas la región no traducida. **(b)** La actividad β-galactosidasa de las fusiones fue medida en medio LB a 0,6 A₆₀₀. Los datos corresponden a la media ± SD de tres réplicas independientes, indicando el valor medio sobre cada columna. Como control se utilizó el vector pMP220 sin inserto.

5.1.2.3. Efecto de las mutaciones *cbrB1* y *cbrB340* sobre el crecimiento celular

El fenotipo derivado de inactivación de *cbrB* en *P. putida* KT2440 ya ha sido descrito en trabajos previos (Amador et al., 2010; García-Mauriño et al. 2013, Amador et al., 2016), donde se señala una disminución de la motilidad tipo *swimming* y un incremento de la formación de *biofilm*, así como una deficiencia de crecimiento cuando se usan arginina, tirosina o citrato como única fuente de carbono (Amador et al., 2016). Para estudiar si los mutantes KTB1 y KTB340 tienen el mismo fenotipo o muestran alguna diferencia, hemos analizado su crecimiento en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono (Fig. 12 en violeta y magenta

respectivamente). El experimento se realizó comparando estas estirpes con las cepas silvestres KT2440-FR (Fig. 12 en gris) y KT2442 (ésta última no se muestra en las gráficas a fin de aligerar los datos, pero se ha comprobado que presenta el mismo crecimiento que KT2440 en todas las condiciones estudiadas), con el mutante MPO401 (Fig. 12 en naranja) utilizado en trabajos previos (García-Mauriño et al. 2013, Amador et al., 2016), y también con el mutante *crcZ crcY* (*crcZY*; cepa KT2440-ZY, Fig. 12 en azul), que nos sirve de control negativo de crecimiento, pues presenta deficiencia de crecimiento en diversos medios mínimos (Moreno et al., 2012; La Rosa et al., 2015).

Inicialmente realizamos ensayos de crecimiento en medio LB y en medio mínimo con succinato como fuente de carbono, pues los datos previos de Amador et al. (2016) establecían que en esas condiciones la ausencia de CbrB no tiene consecuencias sobre el crecimiento de la bacteria. Efectivamente, en medio LB (Fig. 12a) todas las estirpes analizadas crecieron con velocidades similares, por lo que podemos deducir que la falta de CbrB no afecta a la eficacia biológica (*fitness*) de la bacteria cuando ésta crece en medio rico. En el caso de MMScc (Fig. 12b), si bien todos los mutantes $\Delta cbrB$ crecieron sin problemas, la velocidad de crecimiento de KTB1 y MPO401 fue ligeramente menor que la de KTB340, el cual creció de forma muy semejante a la cepa parental.

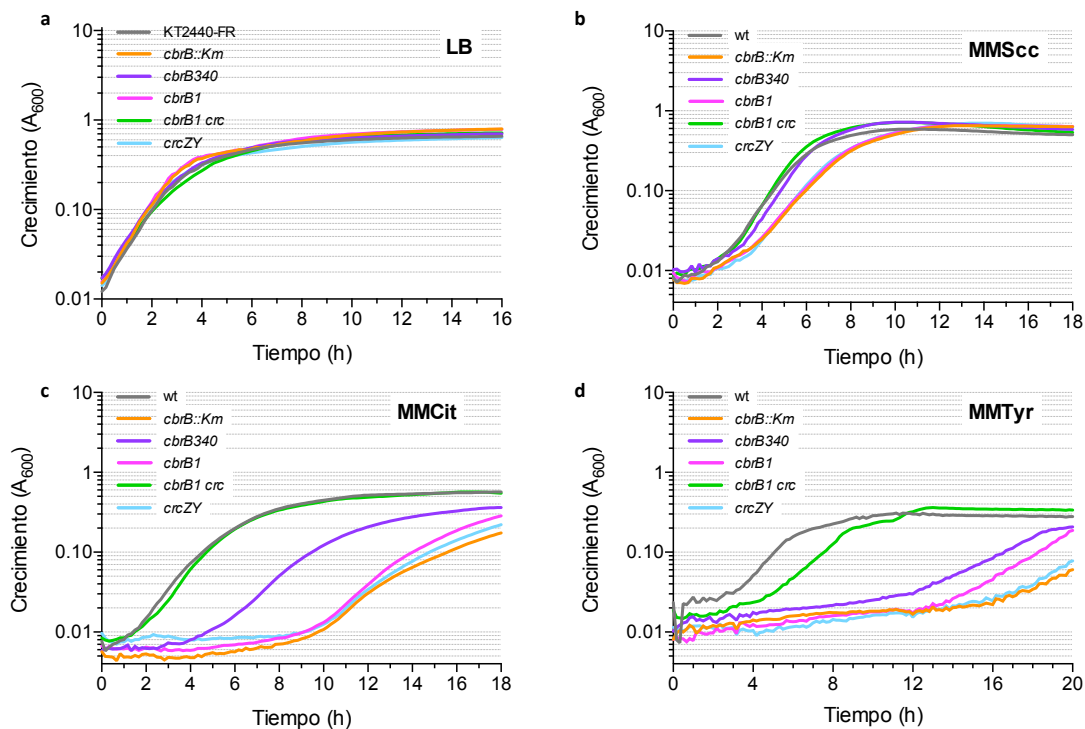


Figura 12 | Efecto de los distintos mutantes *cbrB* en el crecimiento de la bacteria en diferentes medios: **(a)** LB, **(b)** medio mínimo (MM) con succinato 30 mM, **(c)** MM citrato 30 mM y **(d)** MM tirosina 5mM. Se han comparado las estirpes wt (KT2440-FR, en gris), *crcZY* (KT2440-ZY, en azul), *cbrB::Km* (MPO401, en naranja), *cbrB340* (KTB340, en violeta), *cbrB1* (KTB1, en magenta) y el derivado de éste último *cbrB1 crc* (KTB1CRC, en verde). Los datos corresponden a la media de duplicados biológicos con triplicados técnicos medidos en placas multipocillo.

Sin embargo, en otras condiciones sí hemos observado que las diferentes mutaciones en *cbrB* analizadas dan lugar a efectos distintos. El efecto más evidente de la disimilitud entre los mutantes traduccionales KTB1 y KTB340 se observa cuando la bacteria crece en medio mínimo con citrato como única fuente de carbono (Fig. 12c). En estas condiciones las estirpes que carecen por completo de proteína CbrB (KTB1 y MPO401) presentan un retraso en el crecimiento semejante al que sufre el mutante KT2440-ZY, mientras que el mutante KTB340 crece con una tasa de duplicación intermedia a la de la cepa parental y la estirpe KT2440-ZY. En el caso de emplear tirosina como fuente de carbono (Fig. 12d), las posibles diferencias entre los mutantes $\Delta cbrB$ no quedan claras, aunque se intuye cierta ventaja en el crecimiento de KTB340 respecto al de KTB1 y MPO401.

Estos datos confirman que la ausencia de CbrB afecta a la eficacia biológica de la bacteria sólo en determinadas condiciones, como serían los medios MMCit y MMTyr, y que este efecto es más acentuado cuando la ausencia de la proteína CbrB es completa (estirpes KTB1 y MPO401), a diferencia de en KTB340, donde se podría estar produciendo una proteína CbrB*340 carente del dominio de unión a ADN (dominio HTH). Desconocemos a qué es debida esta diferencia en la utilización de determinadas fuentes de carbono de los distintos mutantes *cbrB*. Una posibilidad es que CbrB*340 actúe, de forma limitada, como activador de transcripción sin unirse al ADN, como ya se ha descrito en otros casos (Huala and Ausubel 1989; Huala et al., 1992; Berger et al. 1994; Porrúa et al., 2009).

Curiosamente, durante el proceso de construcción del mutante KTB1 obtuvimos un mutante doble que, además de la mutación en *cbrB*, posee una mutación en el gen *crc* (concretamente una delección de los aminoácidos K₁₃₉, R₁₄₀ y R₁₄₁), al que hemos denominado KTB1CRC. Esta mutación en *crc*, le permite recuperar una tasa de crecimiento muy similar a la de la cepa parental en todas las condiciones analizadas (Fig. 12 en verde).

Este tipo de mutantes compensatorios ya los habíamos obtenido antes en el laboratorio al mutar *crcZ* y *crcY*, pues la ausencia de ambos ARNp le genera un fenotipo hiper-represor y una baja eficacia biológica (*fitness*) que se revierten al mutar *crc*, y perder así su efecto inhibitor sobre diversos genes.

5.1.3. Análisis de la actividad del promotor *PcbrB*

5.1.3.1. Efecto de la secuencia del gen *cbrB* sobre su propio promotor *PcbrB*

Al analizar las diferentes fusiones del promotor de *cbrB* vimos que, curiosamente, la actividad de la fusión larga *PcbrBfw1rv7-lacZ*, que engloba desde el inicio del promotor *PcbrB* hasta el final del gen *cbrB*, es mucho más alta que una construcción similar que contiene el promotor *PcbrB* pero no incluye nada de la secuencia codificante del gen *cbrB*, *PcbrBfw1rv8-lacZ* (Fig. 13a, b).

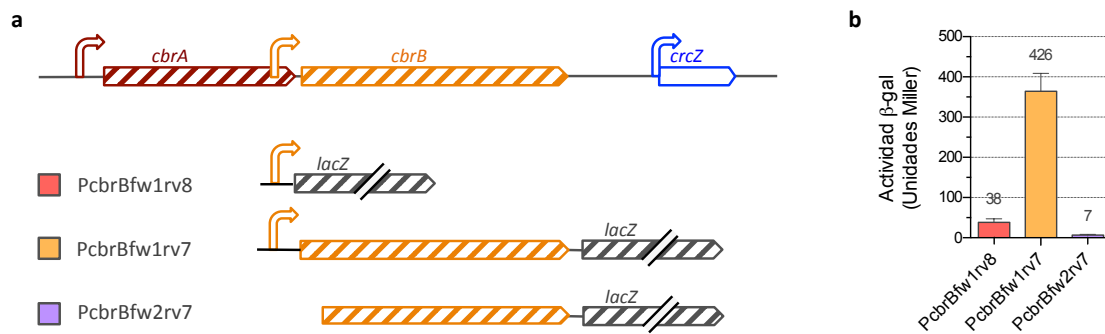


Figura 13 | Análisis de la actividad del promotor *PcbrB*. **(a)** Representación esquemática de las construcciones *PcbrB-lacZ* ensayadas indicando la porción de *cbrB* que incluye cada una. **(b)** Actividad β -galactosidasa de las fusiones ensayadas en medio LB a 0,4 A_{600} . Los datos corresponden a la media \pm SD de triplicados independientes, indicando numéricamente sobre la columna el valor de la media.

Con el objeto de confirmar que las variaciones de actividad β -galactosidasa son consecuencia directa de diferencias en el nivel de transcripción y no de algún evento post-transcripcional no considerado, se midió mediante RT-qPCR el nivel de transcrito *lacZ* derivado de la actividad de *PcbrB*, y se comparó con la actividad β -galactosidasa de las fusiones *PcbrBfw1rv8-lacZ* (contiene el promotor *PcbrB* pero nada del gen *cbrB*), *PcbrBfw1rv7-lacZ* (porta el promotor *PcbrB* así como el gen *cbrB* completo), y *PcrcZ-lacZ* (que nos sirve de indicador externo) (Fig. 14). Los datos obtenidos muestran una relación directa entre la cantidad de transcrito *lacZ* y la actividad galactosidasa resultante del mismo, corroborando los resultados obtenidos en el ensayo de β -galactosidasa (Fig. 13b).

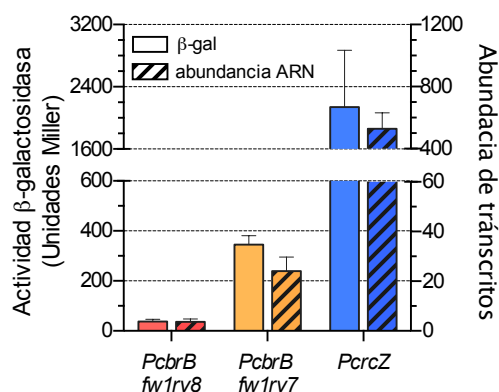


Figura 14 | Comparación de la abundancia de transcrito y de la actividad β -galactosidasa en las fusiones *PcbrBfw1rv8-lacZ*, *PcbrBfw1rv7-lacZ* y *PcrcZ-lacZ*. La abundancia del transcrito *lacZ* (columnas rayadas) se cuantificó mediante RT-qPCR usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito en la metodología. Para ello se utilizó como control interno el transcrito de *tetA*, el gen de resistencia que porta pMP220, el plásmido en el que están las fusiones transcripcionales, y como control externo una estirpe transformada con el plásmido pMP220 sin inserto. Estos datos se compararon con la correspondiente actividad β -gal (columnas lisas) de cada fusión. Los valores corresponden a la media \pm SD de tres ensayos independientes.

Esto nos llevó a tratar de definir la región de *cbrB* indispensable para que su promotor alcance la máxima actividad, objetivo que se abordó mediante la construcción de una batería de fusiones *PcbrB-lacZ* que comparten el extremo 5' pero con un extremo 3' diferente en cada una de ellas (Fig. 15a). Cuando miramos la secuencia de *cbrB* nos llamó la atención la presencia de varias regiones con repeticiones de citosina y guanina (C+G), dos de las cuales (representadas con rombos de color gris oscuro, Fig. 15a) también se encuentran dentro del gen *mvaB*, el gen anterior a *crcY*, mientras que el resto de estas regiones de *cbrB* ricas en C+G no tiene similitud en *mvaB* (representadas con rombos de color claro, Fig. 15a). Las secuencias de las dos series de C+G que comparten los genes *cbrB* y *mvaB* son 5'-CNANNGCNCCCCGGTG-3', localizada en la parte inicial, y 5'-GGTGGCCCGCGCCCTGCAC-3', localizada en la parte central de *cbrB* y *mvaB*. Estas zonas son exclusivas de dichos genes, como se deduce del hecho de que, al buscarlas en el genoma de *P. putida* KT2440 mediante la herramienta web *Bioexpression* (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/bioexpression/> J.C. Oliveros, no publicado), los únicos resultados obtenidos correspondan a los genes *cbrB* (PP4696) y *mvaB* (PP3540), motivo que nos llevó a pensar que pudieran estar cumpliendo alguna función relacionada con CrcZ/CrcY.

Los datos de actividad β -galactosidasa resultantes de estas fusiones, que incluyen el promotor de *cbrB* y fragmentos cada vez mayores del gen *cbrB* (Fig. 15a), muestran que al incluir la primera de las secuencias de C+G de las presentes tanto en *cbrB* como en *mvaB* (el primer rombo oscuro), incluida en las fusiones *PcbrBfw1rv12-lacZ* y *PcbrBfw1rv2-lacZ*, se alcanza la actividad máxima de *PcbrB* (no hay diferencia estadística en la actividad de estas dos fusiones respecto a la actividad de la fusión de referencia *PcbrBfw1rv7*; Fig. 15b). Esto nos permite definir una zona indispensable para la actividad del promotor *PcbrB* correspondiente a los primeros 220 – 290 nt después del inicio de traducción de *cbrB* y apunta a que estas regiones ricas en C+G pudieran tener algún efecto en este fenómeno.

Los datos de los que disponemos actualmente no son suficientes para extraer información sobre el papel de las series de C+G presentes en *cbrB* pero no en *mvaB* (rombos de color claro; Fig. 15a). Si bien parece que la presencia de la primera de las series de C+G exclusiva de *cbrB* tendría algo de influencia en la actividad del promotor *PcbrB* (como se aprecia en la fusión *PcbrBfw1rv9-lacZ*), ésta no es suficiente para que la fusión de *PcbrB* alcance la actividad máxima (Fig. 15b).

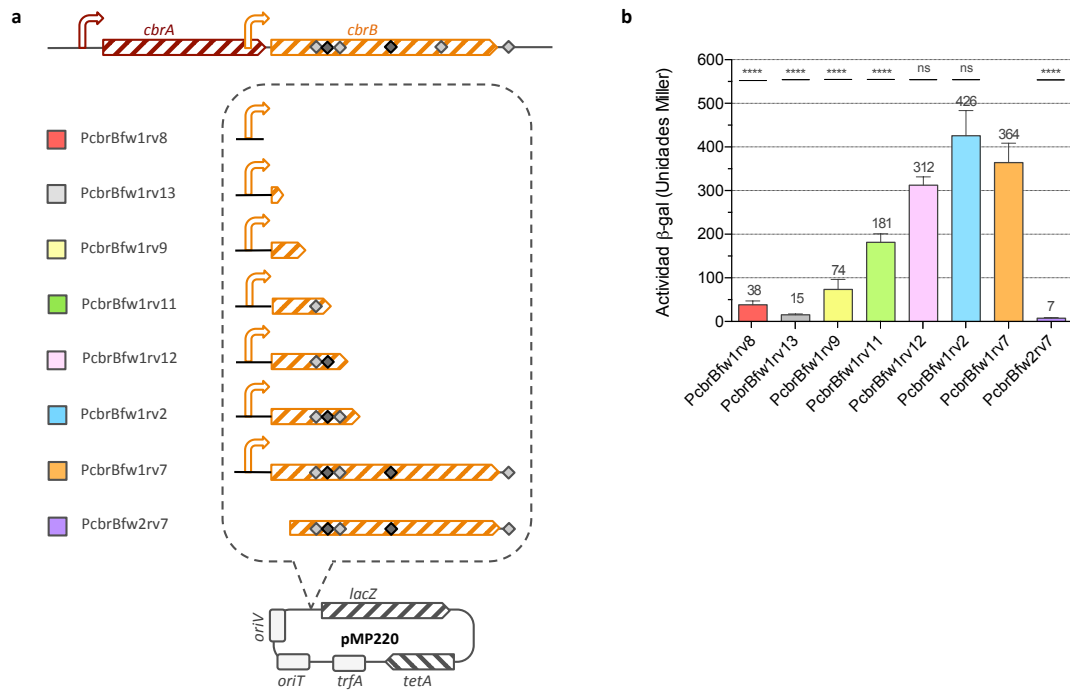


Figura 15 | Análisis de la actividad del promotor *PcbrB* en función de la porción de gen *cbrB* contenida en la fusión. **(a)** Representación esquemática de las diferentes fusiones *PcbrB-lacZ* ensayadas, indicando la porción del gen *cbrB* presente en cada una, así como las series de C+G presentes. Los rombos gris oscuro corresponden a series de C+G presentes en *cbrB* y *mvaB*, y los rombos gris claro a series exclusivas de *cbrB*. **(b)** Actividad β -galactosidasa de las fusiones *PcbrB-lacZ* en medio LB a 0,4 A₆₀₀. Los datos corresponden a tres réplicas independientes. Se realizó un ANOVA para comparar la actividad de la fusión original *PcbrBfw1rv7-lacZ* con las nuevas fusiones, siendo no significativa (ns) respecto a *PcbrBfw1rv12-lacZ* y *PcbrBfw1rv2-lacZ*, y muy significativa (****; *p*-valor < 0,001) respecto a las demás.

5.2. ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS NUCLEOPROTEICOS DE Crc, Hfq Y ARN MEDIANTE MICROCALORIMETRÍA

Cuando se inició este trabajo, una de las grandes preguntas concernientes a la represión catabólica en *P. putida* era cómo la proteína Crc reprime la traducción de los ARNm diana. Se sabía que, aunque Crc no se une por sí sola a los ARNm diana, pues es Hfq quien realiza el reconocimiento inicial (Milojevic et al., 2013; Moreno et al., 2015), la presencia de Crc hace que el complejo tripartito Hfq-Crc-ARNm sea más estable (Moreno et al., 2015), pero se desconocía el mecanismo subyacente. Crc podría, por ejemplo, estar aumentando la afinidad o la estabilidad de Hfq por el ARNm. Los trabajos previos de Moreno et al. (2015) indican que la presencia de Crc aumenta la estabilidad *in vitro* del complejo tripartito Hfq-ARN-Crc, cuando ésta es analizada mediante EMSA. Estas evidencias coinciden con datos más recientes (Sonnleitner et al., 2017b) según los cuales la unión de Hfq con el ARN *amiE* se ve incrementada alrededor de 4 veces en presencia de Crc. Otra posibilidad no analizada en ese momento sería que Crc sustituya a Hfq en la unión al ARNm de manera que Hfq quedase disponible para ejercer otras funciones independientes de Crc.

Nuestra estrategia para tratar de discernir el mecanismo de acción de Crc consistió en llevar a cabo un experimento de ITC (Calorimetría de titulación isotérmica, en inglés *Isothermal titration calorimetry*) donde se mide el calor generado como consecuencia de la unión de una molécula a otra hasta llegar a saturación, permitiendo el cálculo de la constante de disociación (K_D) de dicha unión.

Para realizar el ensayo se seleccionó un tampón HEPES (50 mM HEPES pH 7,5, 250 mM NH_4Cl , 10% glicerol) con el cual ya se había medido con éxito la unión de Hfq al ARN DsrA (Mikulecky et al., 2004). Aunque no se muestran los datos, antes de llevar a cabo el experimento de ITC confirmamos mediante ensayos de retraso en gel que el complejo tripartito Hfq-ARN-Crc puede formarse en estas condiciones, puesto que los ensayos originales en los que se había visto el complejo tripartito Hfq-ARN-Crc se habían realizado en tampón HEPES+ MgCl_2 (10 mM HEPES-KOH pH 7,9, 35 mM KCl, 2 mM MgCl_2) (Moreno et al., 2015). Tras esta comprobación se llevó a cabo el ensayo de ITC utilizando como ARN diana el ARN *alkS* y midiendo su constante de disociación con Hfq en dos condiciones distintas: en ausencia de Crc ($45 \pm 11,3$ nM, Fig. 16a) y en presencia de Crc (39 ± 24 nM, Fig. 16b). Los datos obtenidos indican que la constante de disociación (K_D) es semejante en ambas condiciones, por tanto parecería que en estas condiciones la presencia de Crc no mejora la afinidad de Hfq a *alkS*. No obstante, esto no elimina la posibilidad de que Crc esté afectando la unión de Hfq al ARN, algo que sí ha sido comprobado mediante ensayos tipo EMSA (Moreno et al., 2015; Sonnleitner et al., 2017b), sino que simplemente concluye que su participación no es analizable mediante ITC en estas condiciones; quizás porque el calor producido por la unión de Crc sea muy poco en comparación al que genera la unión de Hfq, o quizás porque en estas condiciones esté teniendo lugar una compensación de calores endo y exotérmicos que camufle la unión de Crc al complejo.

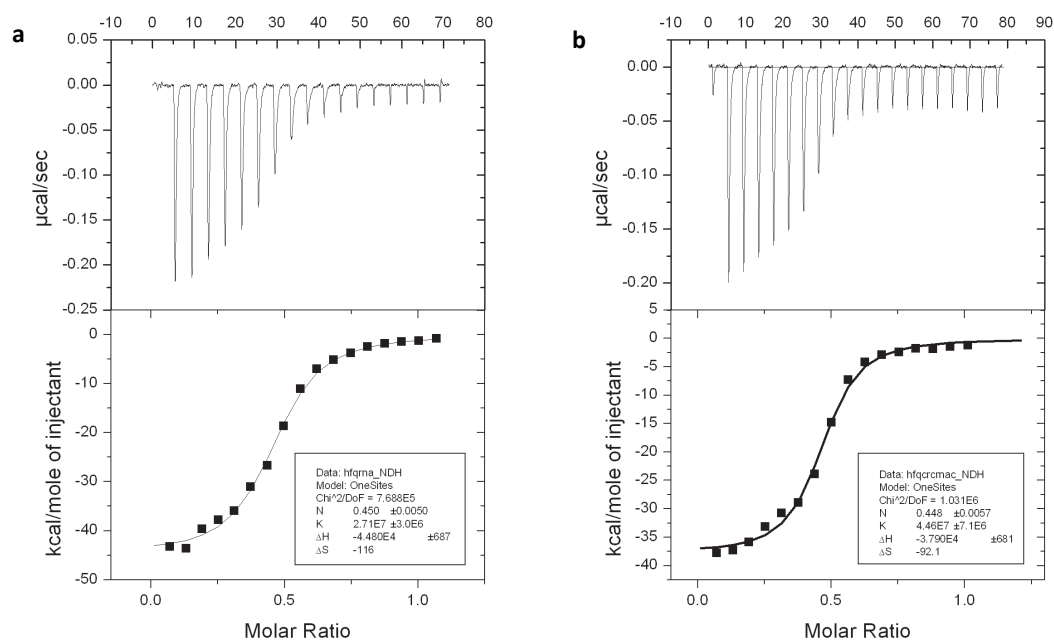


Figura 16 | Estimación de la cinética de unión de Hfq y/o Crc al ARN *alkS* medida por ITC. Se comprobaron dos condiciones: **(a)** en ausencia de Crc, titulando 2 μM Hfq_{HEX} con 20 μM ARN *alkS* y **(b)** en presencia de Crc, titulando 2 μM Hfq_{HEX} + 2 μM Crc con 20 μM ARN *alkS* + 2 μM Crc. Los datos mostrados corresponden a una única réplica, pero se realizaron duplicados de donde obtuvimos que la $K_d=45 \pm 11,3$ nM y la $K_d= 39 \pm 24$ nM, respectivamente, descartándose diferencias significativas ocasionadas por la presencia de Crc.

5.3. EFECTO DE LA INACTIVACIÓN DE LOS GENES *hfq* Y *crc* EN CÉLULAS CRECIENDO EN MEDIO MÍNIMO CON SUCCINATO

Gran parte de los datos de este tercer capítulo están recogidos en el artículo, incluido en los anexos de esta tesis doctoral:

[Sánchez-Hevia D.L., Yuste, L., Moreno R. and Rojo F. \(2018\) Influence of the Crc and Hfq global regulators on the control of iron homeostasis in *Pseudomonas putida*. Bajo revisión en *Environmental Microbiology*.](#)

En la segunda parte de esta tesis doctoral nos propusimos determinar qué funciones reguladoras ejercen Hfq y Crc en un medio diferente al medio LB - condición en la que estas proteínas han sido ampliamente estudiadas - distinguiendo entre aquellas que ejercen conjuntamente de las que pueden ejercer de forma individual, y centrando nuestra atención en éstas últimas.

Como punto de partida se comparó el efecto de la inactivación de *hfq* y/o de *crc* sobre el transcriptoma de la célula en condiciones en las que la represión catabólica es baja, en concreto en medio mínimo con succinato como fuente de carbono (MMSc) donde, debido a los altos niveles de CrcZ y CrcY (La Rosa et al., 2015), Crc debería ser mayoritariamente no funcional mientras que Hfq aún podría estar presente en niveles suficientes como para ejercer otras funciones reguladoras en las que Crc no intervenga de forma directa. El medio seleccionado exhibe otra ventaja, y es que, a diferencia de lo que ocurre en otros medios, los mutantes *crc* (KTVC) y *hfq* (KT2440Δ*hfq*) presentan velocidades de crecimiento similares a las de la cepa parental, con una diferencia en su tiempo de generación del 2 - 3% respecto al de la cepa wt KT2440 (Fig. 17). Sólo el mutante doble *hfq crc* (KTHC) crece visiblemente más despacio que la estirpe silvestre (Fig. 17).

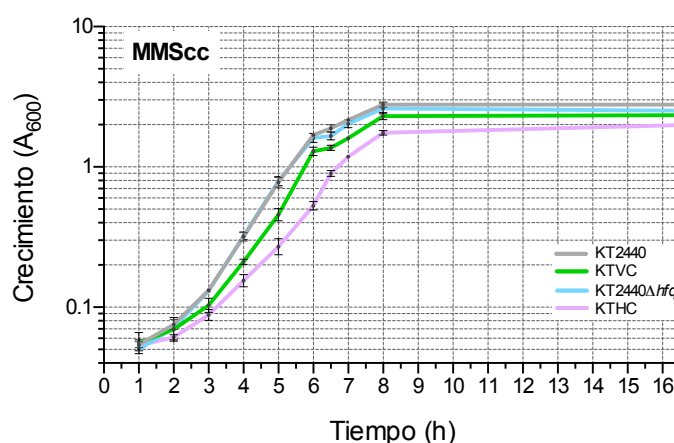


Figura 17 | Crecimiento de *P. putida* KT2440 y de sus derivados *crc* (KTVC, en verde), *hfq* (KT2440Δ*hfq*, en azul) y *hfq crc* (KTHC, en lila) en MMSc, el medio donde se ha llevado a cabo el ensayo de transcriptómica. Los datos corresponden a la media \pm SD de duplicados biológicos crecidos con fuerte aireación en matraces, las mismas condiciones que se utilizaron para cultivar las células de las que se obtuvo el ARN para los ensayos de transcriptómica. Los tiempos de generación obtenidos son 51 ± 3 min para KT2440, 53 ± 2 min para KTVC, 51 ± 4 min para KT2440Δ*hfq* y 62 ± 4 para el KTHC.

En este punto resulta conveniente puntualizar que, a pesar de que Hfq y Crc son reguladores post-transcripcionales, se sabe que su inactivación tiene un efecto notable sobre el transcriptoma celular (Sonnleitner et al., 2006; Moreno et al., 2009a; Kim et al., 2013), ya que afecta indirectamente a la expresión de un gran número de genes al inhibir la traducción de ARNm de reguladores transcripcionales, o ARNm de proteínas implicadas en la captación de sustratos que desencadenan la inducción de diversas rutas catabólicas.

5.3.1. Primer análisis transcripcional (RNA-Seq) y descripción de la cepa KT2440-FR

Se realizaron dos ensayos de transcriptómica similares, en los que la principal diferencia fue el origen de la cepa silvestre KT2440. En el primero de ellos, la cepa KT2440 utilizada fue la tradicionalmente empleada en nuestro laboratorio, obtenida de Ken Timmis en 1986, y a la que hemos denominado KT2440-FR para distinguirla de otras variantes. Para la realización de este primer ensayo de transcriptómica se emplearon muestras de ARN de la estirpe silvestre (KT2440-FR) y los mutantes *crc* (KTCRC), *hfq* (KT2440 Δ *hfq*) y *hfq crc* (KTHC), correspondientes a cultivos crecidos en MMScc hasta 0,6 A₆₀₀. Consideramos que un gen estaba diferencialmente expresado entre las dos cepas comparadas cuando los niveles de su ARN cambiaba $\geq \pm 3$ veces ($\log_2FC \geq |1,585|$) con un valor de FDR $\leq 0,01$, valores según los cuales, la inactivación del gen *crc* altera la expresión de 126 genes, la inactivación de *hfq* altera 209 genes, mientras que en el mutante doble *hfq crc* se modifica la expresión de 472 genes. Sin embargo, al analizar en detalle los cambios de expresión génica de estas estirpes se puso de manifiesto que la estirpe parental KT2440-FR había sufrido una delección espontánea de un fragmento de cromosoma que afectaba a más de 30 genes (Fig. 18). Nos dimos cuenta de que, en las estirpes KT2440 Δ *hfq* y KTHC, la mayoría de los genes que presentaban un aumento de expresión más elevado correspondían a una zona del genoma comprendida entre los genes PP2225 y PP2259, con aumentos de expresión de hasta más de 2.000 veces (\log_2FC máximo de 11,88 en KT2440 Δ *hfq* y de 11,05 en KTHC), un efecto difícilmente explicable sólo por la falta de Hfq. Al visualizar los datos con el programa IGV (del inglés *Interactive Genomes View*”; Broad Institute) se comprobó que en el caso de las estirpes KT2440-FR y KTCRC no había lecturas en esa zona, mientras que sí las había en las otras dos estirpes (Fig. 18). La cepa KTCRC proviene directamente de KT2440-FR; sin embargo, KT2440 Δ *hfq* y el doble mutante KTHC derivan de un aislado de KT2440 que Víctor de Lorenzo obtuvo del laboratorio de Ken Timmis hacia 1988. Por lo tanto, los datos observados sugieren que, en algún momento posterior a 1987, la cepa KT2440-FR sufrió una delección de la zona comprendida entre los genes PP2225 y PP2259, sin que se pueda acotar los límites exactos de la misma, debido a las limitaciones de la técnica de RNA-Seq.

Nuestra información sobre las consecuencias o relevancia de la delección génica experimentada por KT2440-FR es limitada. De entre los genes que parecen haber sido afectados se pueden destacar *fepA* (PP2242), que codifica un receptor de membrana externa de captación de hierro, el receptor de aerotaxis *aer-1* (PP2257), el transportador de dicarboxilatos *dctA-III* (PP2255), el transportador de treonina y homoserina *rhtA* (PP2239), el

transductor de quimiotaxis *pctB* (PP2259), o el transportador de K^+/H^+ codificado por el operón *mrpGFEDCAB* (genes PP2225-PP2226-PP2227-PP2228-PP2229-PP2230).

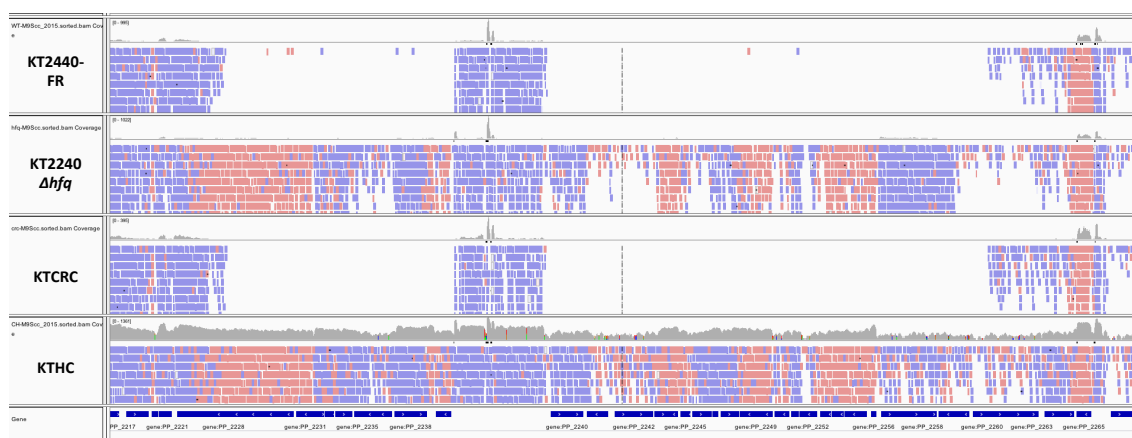


Figura 18 | Sección del alineamiento de lecturas de ARN, visualizadas mediante el programa IGV, de la región comprendida entre los genes PP2217 y PP2265, correspondientes al ensayo de RNA-Seq en el que se compararon las estirpes KT2440-FR, KT2440 Δ hfq, KTCRC y KTHC, colocadas en ese orden en la imagen. Las lecturas en sentido 5' \rightarrow 3' están representadas en color azul y las lecturas en sentido 3' \rightarrow 5' en color rojo. Se observa una evidente ausencia de lecturas desde el gen PP2225 al gen PP2259 en las estirpes KT2440-FR y KTCRC, a excepción de una zona intergénica entre PP2239 y PP2240. Esta zona corresponde a uno de los siete operones ribosomales presentes en esta estirpe (ARNr 16S, 23S y 5S), estando las otras 6 copias en otros lugares del genoma; las lecturas que se observan en la figura habrían sido asignadas a esta zona por homología de secuencia, aunque esta copia del operón ribosomal no esté presente en KT2440-FR.

A fin de dictaminar si la delección de KT2440-FR tenía consecuencias en la eficiencia biológica de la bacteria se comparó su velocidad de crecimiento con la de la estirpe control KT2440 (obtenida del laboratorio de Víctor de Lorenzo), inoculando cultivos de ambas estirpes en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono en placas multipocillo, y siguiendo su crecimiento con el lector TECAN Infinite m200. Como se puede ver en la figura, no se aprecian diferencias entre las dos estirpes cuando la fuente de carbono es succinato (MMScc, Fig. 19b) o sacarosa (MMSuc, Fig. 19f), pero KT2440-FR crece algo más despacio que KT2440 cuando utiliza citrato (MMCit, Fig. 19c), glucosa (MMGlc, Fig. 19d) o fumarato (MMFum, Fig. 19e). En medio LB, KT2440-FR parece arrancar un poco más tarde, aunque después el tiempo de duplicación es muy similar (Fig. 19a).

Dado que algunos de los genes afectados por la delección podrían estar implicados en quimiotaxis se decidió comparar la motilidad natatoria (*swimming*) de las estirpes KT2440 y KT2440-FR, presentando esta última menor motilidad tipo *swimming* (Fig. 20g). La motilidad tipo *swimming* fue analizada en diferentes fuentes de carbono, observándose diferencias entre KT2440 y KT2440-FR en medio mínimo con succinato (Fig. 20a), fumarato (Fig. 20b), citrato (Fig. 20c) y glucosa (Fig. 20d), pero no en medio mínimo con sacarosa (Fig. 20e).

No se han observado diferencias entre KT2440 y KT2440-FR en otros fenotipos comprobados a lo largo de esta tesis doctoral, tales como producción de pioverdina, niveles de los ARNp PrrF1 y PrrF2, concentración intracelular de hierro o expresión de aquellos genes cuyos niveles fueron comprobados mediante RT-qPCR, entre otros (datos no mostrados).

Dado que la ausencia de alrededor de 30 genes en la estirpe control suponía un cambio demasiado grande como para poder obtener resultados fiables sobre el efecto de la inactivación de *hfq*, decidimos repetir el ensayo, esta vez utilizando como cepa silvestre el aislado de *P. putida* KT2440 cedido por Víctor de Lorenzo, del que derivan los mutantes KT2440 Δ *hfq* y KTHC, y generando un nuevo mutante en el gen *crc* a partir de ese aislado (cepa KTVC, obtenida por intercambio alélico con un alelo *crc::tet*). De esta manera, comparamos el transcriptoma de las estirpes KT2440, KTVC, KT2440 Δ *hfq* y KTHC, todas ellas isogénicas, crecidas exponencialmente en medio MMScc. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

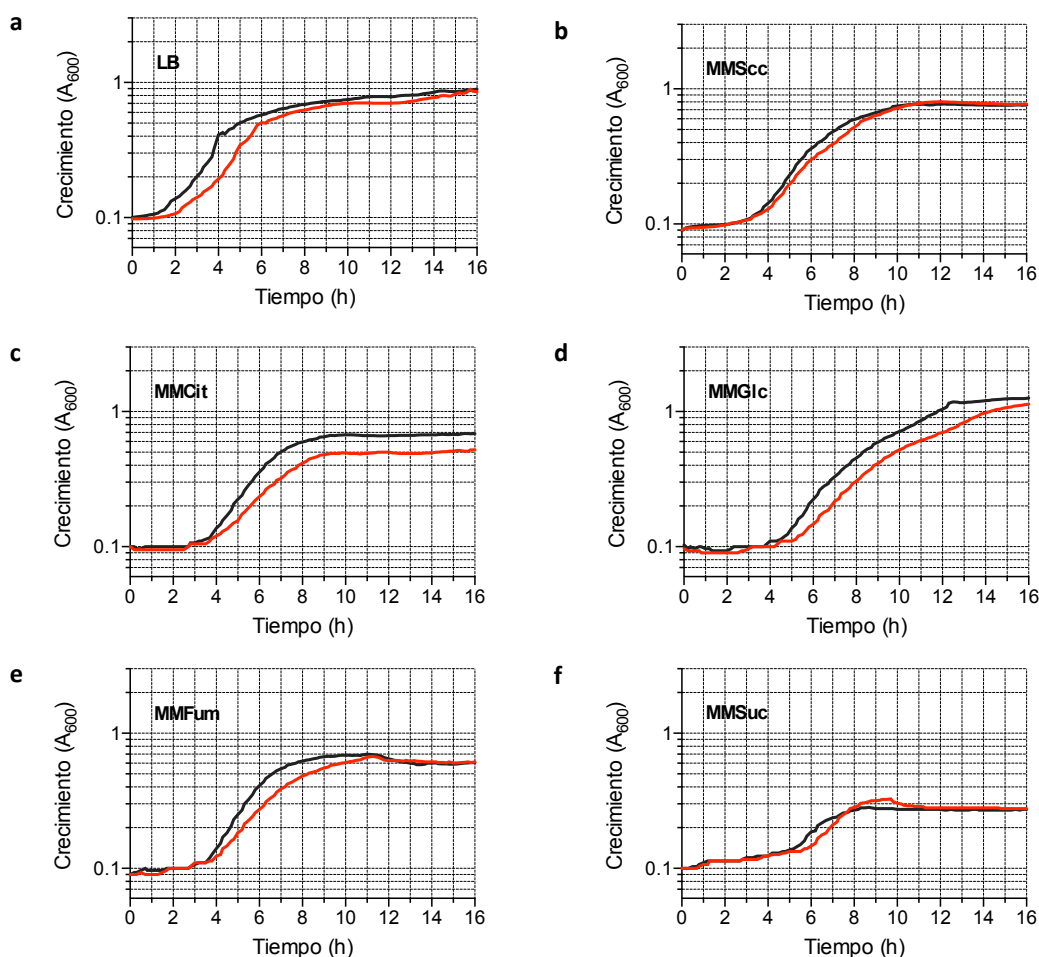


Figura 19 | Comparación del crecimiento de *P. putida* KT2440 (líneas negras) y KT2440-FR (líneas rojas) en (a) medio LB y en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono: (b) succinato, (c) citrato, (d) glucosa, (e) fumarato o (f) sacarosa. Los datos mostrados corresponden a la media de dos ensayos independientes con triplicados técnicos.

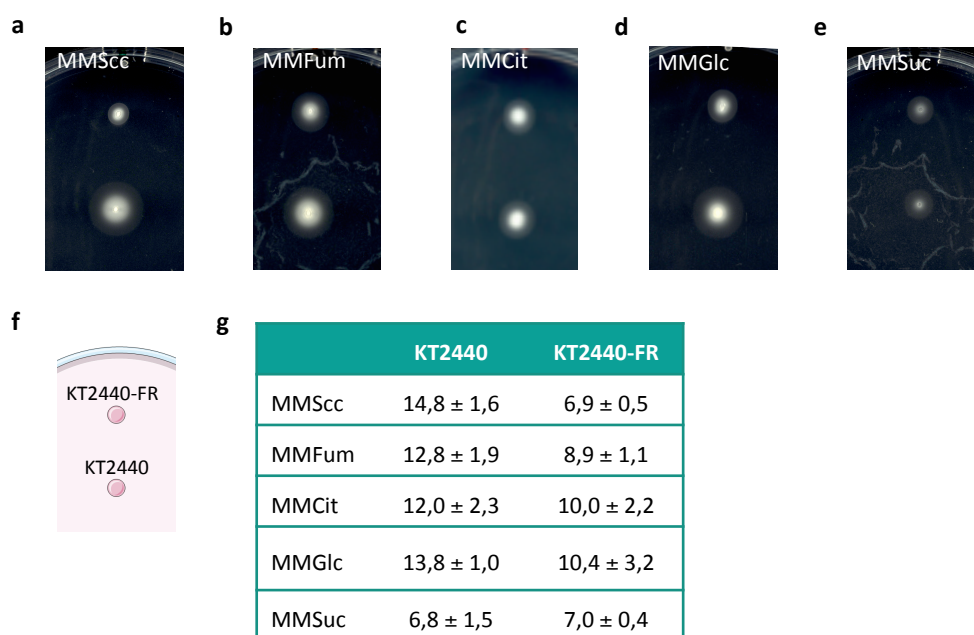


Figura 20 | Comparación de la motilidad tipo *swimming* en las estirpes *P. putida* KT2440 y KT2440-FR en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono: **(a)** succinato, **(b)** fumarato, **(c)** citrato, **(d)** glucosa y **(e)** sacarosa. **(f)** Disposición de las estirpes en las fotografías. **(g)** El experimento se realizó cuatro veces. Los datos corresponden al radio (en mm) de la dispersión desde el punto de inóculo inicial, indicándose la media ± SD obtenidas para cada estirpe y condición.

5.3.2. Segundo análisis transcripcional (RNA-Seq) utilizando la cepa KT2440 y los mutantes isogénicos derivados de ella

5.3.2.1. Visión general de los resultados del RNA-Seq y comprobación por RT-qPCR

Los resultados obtenidos en este segundo ensayo de transcriptómica indican que, considerando como cambio de expresión significativo aquél que es $\geq \pm 3$ veces ($\log_2FC \geq |1,585|$) y $FDR \leq 0,01$), en el mutante *crc* (KTVC) cambian 82 genes respecto a la cepa silvestre, en el mutante *hfq* (KT2440 Δhfq) 179 genes y en el mutante doble *hfq crc* (KTHC) 301 genes (Fig. 21; Tablas S1, S2 y S3), valores semejantes a los obtenidos en el primer ensayo de transcriptómica. De estos, el número de genes que, como consecuencia de la inactivación de *hfq* y/o *crc*, tienen niveles de ARNm más bajos que en la cepa silvestre es mayor que el número de genes que han visto su expresión incrementada, efecto especialmente evidente en el caso del mutante *crc* (KTVC) (Fig. 22). Dado que Hfq y Crc son inhibidores post-transcripcionales, aquellos genes susceptibles de estar regulados por estas proteínas deberían mostrar un aumento de expresión en los mutantes en *hfq* y *crc*; mientras que los genes que experimentan un descenso de expresión se deberán, al menos mayoritariamente, a efectos indirectos desencadenados por la falta de Hfq y/o Crc.

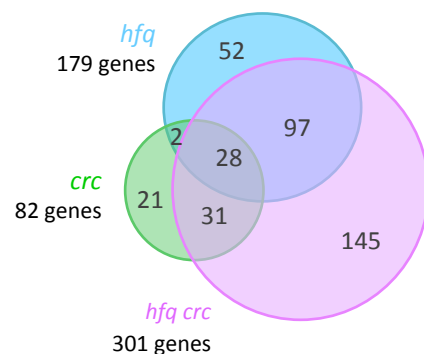


Figura 21 | Número de genes que, según nuestros resultados de RNA-Seq, tienen un cambio de expresión de al menos ± 3 veces ($\log_2FC \geq |1,585|$ y $FDR \leq 0,01$) en las estirpes *crc* (KTVC, círculo verde), *hfq* (KT2440 Δ *hfq*, círculo azul) o *hfq crc* (KTHC, círculo lila) respecto a la estirpe control KT2440. Los genes afectados en dos o más estirpes mutantes están indicados en las intersecciones de los círculos.

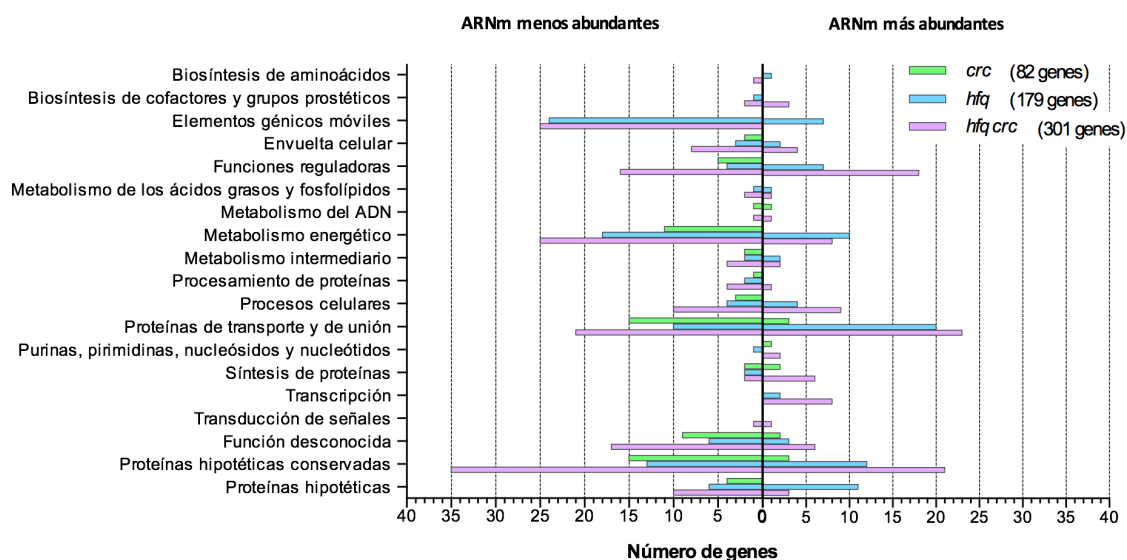


Figura 22 | Clasificación por categorías funcionales de los genes que presentan cambio de expresión en los mutantes *crc* (KTVC, barras verdes), *hfq* (KT2440 Δ *hfq*, barras azules) o *hfq crc* (KTHC, barras de color lila), según los resultados de la transcriptómica (y $\log_2FC \geq |1,58|$ y $FDR \leq 0,01$).

Al analizar cuáles son los genes afectados se observa que la mayoría corresponden a proteínas hipotéticas, o proteínas de función desconocida, todos ellos por tanto ORFs sin función asignada. De entre el resto de categorías funcionales destacan los grupos de metabolismo energético, funciones reguladoras y proteínas de transporte y unión (Fig. 22).

Tabla 6 | Comprobación mediante RT-qPCR de los resultados de la transcriptómica en un número seleccionado de genes. Las muestras de ARN se obtuvieron de células crecidas en MMScc hasta fase exponencial (0,6 A₆₀₀). Los datos, obtenidos a partir de triplicados biológicos y técnicos, se analizaron mediante el método de 2^{-ΔΔCt} (ver Métodos). Los cambios en los niveles de ARN se indican en “número de veces” respecto a la estirpe silvestre KT2440 (wt). Rojo, genes con un cambio ≥ 3 veces; verde, genes que cambian ≤ -3 veces; ND, no determinado. Se incluyen los resultados, en número de veces, de los cambios observados en el ensayo de RNA-Seq (“-”, cambio < ± 2 veces y/o FDR > 0,01; “*”, cambio > ± 2 veces y FDR ≤ 0,01).

Locus	Símbolo	<i>crc</i> vs. wt		<i>hfq</i> vs. wt		<i>hfq crc</i> vs. wt	
		RT-qPCR	RNA-Seq	RT-qPCR	RNA-Seq	RT-qPCR	RNA-Seq
PP0230	<i>tauD</i>	1,1 ± 0,5	-2,6*	1,2 ± 0,8	-	-3,2 ± 1,0	-5,1
PP0232	<i>tauB</i>	-5,1 ± 2,6	-3,0	1,2 ± 0,5	-	-7,1 ± 1,4	-3,9
PP0235	<i>lsfA</i>	-2,5 ± 0,8	-3,0	-1,4 ± 0,3	-	ND	-2,7*
PP0238	<i>ssuD</i>	1,8 ± 1,6	-	3,4 ± 2,0	3,8	-20,2 ± 13,4	-3,4
PP0272		-2,3 ± 1,4	-4,2	1,4 ± 0,4	-	-1,6 ± 0,3	-
PP0553	<i>acoC</i>	-1,7 ± 1,0	-	80,5 ± 40,7	39,9	154,3 ± 68,7	63,1
PP0718		-1,8 ± 0,2	-3,4	-1,1 ± 0,6	-	ND	-
PP0843	<i>iscU</i>	-1,8 ± 0,5	-	1,0 ± 0,2	2,1*	1,4 ± 0,3	3,2
PP0933	<i>mreB</i>	-1,2 ± 0,4	2,3*	-1,8 ± 0,5	-	1,1 ± 0,4	4,2
PP0946	<i>sodA</i>	-1,7 ± 0,4	-	2,6 ± 0,6	20,1	2,1 ± 0,6	-
PP1009	<i>gap-1</i>	1,2 ± 0,2	2,5*	1,5 ± 0,4	-	ND	-
PP1121		-1,3 ± 0,5	-4,5	1,3 ± 0,6	-	ND	-
PP1167	<i>dctM</i>	1,0 ± 0,2	3,1	3,2 ± 0,6	8,0	1,9 ± 0,4	5,1
PP1317	<i>petA</i>	-1,1 ± 0,7	-	-5,2 ± 2,2	-4,1	-3,0 ± 1,3	-
PP2010		-2,5 ± 0,8	-3,2	-4,0 ± 1,4	-6,1	ND	-5,7
PP2206	<i>yegQ</i>	1,1 ± 0,5	-	-3,5 ± 1,3	-7,8	-1,3 ± 0,4	-
PP2260		-2,2 ± 0,8	-9,1	1,2 ± 0,4	-	ND	-
PP3436	<i>rarD-2</i>	1,2 ± 0,3	4,0	1,3 ± 0,5	-	ND	-
PP3639		-1,2 ± 0,6	-6,5	-1,1 ± 0,5	-	ND	-
PP3797		-1,5 ± 0,5	-	-5,1 ± 0,9	-2,5*	-11,2 ± 1,7	-4,0
PP3804		-2,2 ± 0,4	-	-7,4 ± 1,9	-5,5	-15,7 ± 1,5	-8,2
PP4116	<i>aceA</i>	-3,6 ± 1,5	-4,0	-2,6 ± 0,8	-	-3,8 ± 1,0	-2,7*
PP4216	<i>pvdE</i>	-2,2 ± 1,0	-10,7	-1,8 ± 0,7	-5,3	-2,2 ± 1,3	-15,9
PP4217	<i>fpvA</i>	-2,0 ± 0,7	-	-4,1 ± 1,3	-2,9*	-11,5 ± 4,0	-6,5
PP4219	<i>ppsD</i>	-2,7 ± 0,9	-12,3	-1,8 ± 0,7	-7,5	-1,1 ± 0,8	-14,7
PP4244	<i>pvdS</i>	-2,1 ± 0,7	-	3,6 ± 1,2	2,7*	3,5 ± 0,9	4,6
PP4245	<i>pvdY</i>	-4,5 ± 0,8	-3,7	-3,2 ± 0,7	-2,5*	-30,1 ± 8,1	-4,3
PP4250	<i>ccoN-1</i>	-2,4 ± 1,4	-2,0*	-10,3 ± 3,8	-6,3	-9,9 ± 4,0	-4,6
PP4253	<i>ccoP-1</i>	-1,2 ± 0,8	-4,8	-9,3 ± 0,5	-8,4	-11,5 ± 7,6	-10,1
PP4612	<i>fecR</i>	-2,4 ± 0,8	-	1,6 ± 0,5	-	1,2 ± 0,4	3,6
PP4650	<i>cioB</i>	-2,5 ± 0,3	-3,2	-1,3 ± 0,5	-	-3,9 ± 0,8	-
PP4728	<i>grpE</i>	1,3 ± 0,3	2,4*	1,1 ± 0,2	-	ND	-
PP4730	<i>fur</i>	1,3 ± 0,2	-	1,4 ± 0,2	-	1,2 ± 0,1	2,4*
PP5291	<i>pyrE</i>	1,9 ± 0,5	5,8	-1,5 ± 0,2	-	2,8 ± 0,7	7,5
PP5307	<i>exbD</i>	-1,1 ± 0,9	3,6	3,5 ± 0,9	10,5	3,3 ± 0,4	20,3
PP5383	<i>copR</i>	-1,6 ± 0,7	-2,6*	-2,4 ± 0,8	-	-6,6 ± 2,7	-5,7

Hemos validado los resultados del ensayo de RNA-Seq en un amplio número de genes mediante RT-qPCR. Como puede verse en la tabla 6, se confirman la mayoría de los resultados de la transcriptómica, pero no todos. En general, en aquellos genes que en la transcriptómica sólo cambian en el mutante KTVC (genes PP0272, PP0718, PP1121, PP2260, *rarD-2* y PP3639) o KT2440 Δ *hfq* (*sodA*, *petA* y *yegQ*) no se observó variación en la cantidad de ARN cuando se analizó mediante RT-qPCR, quizás porque la técnica de RT-qPCR es menos sensible o quizás porque se traten de falsos positivos. Sin embargo, sí que se confirmó el cambio de expresión en varios genes que en la transcriptómica sólo parecían cambiar en el mutante doble KTHC (*iscU*, *mreB*, PP3797, *fpvA*, *pvdS*, *fecR* y *copR*). También resulta curiosa la detección, mediante RT-qPCR, de variación de expresión en casos no detectados en el RNA-Seq, revelando que algunos genes que parecían afectados sólo en el mutante doble KTHC también lo están en KT2440 Δ *hfq* (PP3797, *fpvA*, *pvdS* o *pvdY*), lo que evidencia que ése cambio es debido a la inactivación de *hfq*.

5.3.3. Posible efecto de Hfq en la regulación de los profagos

En *P. putida* KT2440 hay anotados cuatro profagos: el profago 1 se extiende desde los genes PP3849 a PP3920, el profago 2 de PP3026 a PP3066, el profago 3 de PP2266 a PP2297 y el profago 4 de PP1532 a PP1584 (Wu et al., 2011; Martínez-García et al., 2015a), siendo el profago 1 el más grande de todos. Sorprendentemente, los resultados de transcriptómica mostraban un descenso muy grande, de hasta -2.000 veces, en la expresión de los genes correspondientes al profago 1 en KT2440 Δ *hfq* y en su derivado KTHC (\log_2 FC de -11,25 y -11,09 respectivamente para el gen PP3909). Al no observar lecturas de dichos genes en las estirpes KT2440 Δ *hfq* y KTHC con el visualizador IGV (Fig. 23), nos planteamos si el profago 1 estaba presente en las estirpes mencionadas.

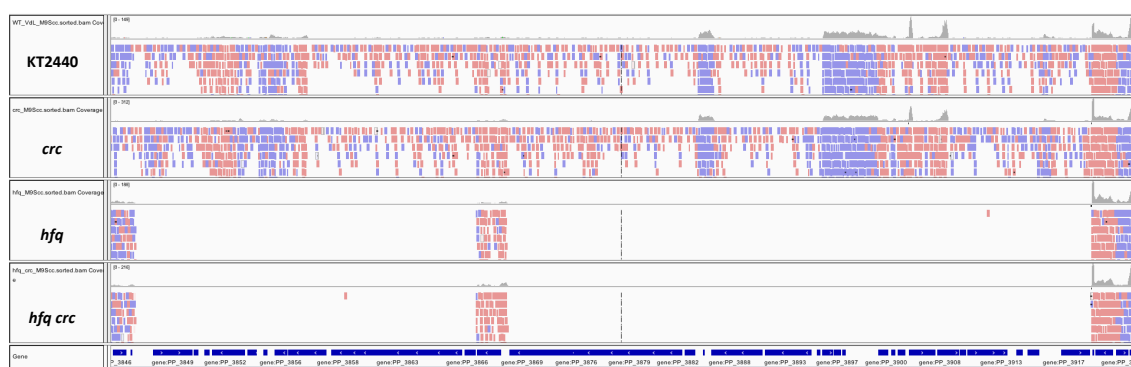


Figura 23 | Sección del alineamiento de las lecturas del RNA-Seq con el programa IGV para la región génica correspondiente al profago 1, comparando las estirpes KT2440 (wt), KTVC (*crc*), KT2440 Δ *hfq* (*hfq*) y KTHC (*hfq crc*). Las lecturas en sentido 5' \rightarrow 3' están representadas en color azul y las lecturas en sentido 3' \rightarrow 5' en color rojo. Se evidencia la ausencia de lecturas en los genes correspondientes al profago 1 en los mutantes *hfq* y *hfq crc*.

Para constatar la presencia o ausencia del profago 1 en nuestras estirpes de estudio se diseñaron tres parejas de oligonucleótidos, PP3849dir-PP3850rev y PP3919dir-PP3920rev para amplificar los genes de los extremos del profago; y PP3868dir-PP3868rev para amplificar el gen PP3868, localizado en el centro del profago 1 y al cual se le habían atribuido lecturas en el ensayo de transcriptómica. Si bien en la cepa parental se observan productos de PCR de los tamaños esperados en los tres casos, en el mutante *hfq* sólo se obtuvo amplificación del gen PP3868 (Fig. 24), lo que nos llevó a concluir que el profago 1 se ha escindido de *P. putida* KT2440 Δ *hfq*.

La aparente amplificación del gen PP3868 observada en el mutante *hfq* (Fig. 24), que codifica una transcriptasa reversa/maturasa, es debida a la presencia de otros 7 genes en *P. putida* KT2440 con ≥ 98 % de homología con este gen, lo que también justifica las lecturas que el software había asignado al gen PP3868, y que en realidad deben corresponder a los otros 7 genes presentes en KT2440 con alta homología con PP3868.

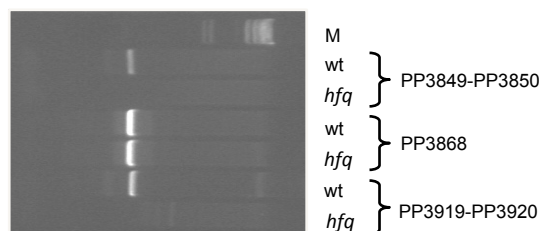


Figura 24 | Análisis de la presencia del profago 1 en la cepa silvestre (wt; KT2440) y en el mutante *hfq* (KT2440 Δ *hfq*) mediante PCR. Se han usado las parejas de cebadores PP3849dir y PP3850rev, PP3868dir y PP3868rev, y PP3919dir y PP3920rev. La línea M indica el marcador de ADN.

Por otro lado, los niveles de ARNm de bastantes genes correspondientes al profago 3 aparecen sobre-expresados en mayor o menor medida en la cepa mutante en *hfq* respecto a la cepa silvestre (aunque no todos pasen los filtros utilizados), y 11 de los 52 genes que forman el profago 4 (PP1532 a PP1584) están claramente sobre-expresados en este mutante. Estos datos, unidos a la ausencia del profago 1 en esta estirpe, sugieren que Hfq podría afectar a la regulación de la decisión del paso lisis/lisogenia, ya sea directamente o como consecuencia del estrés metabólico que se ha visto que sufre este mutante (García-Martínez et al., 2015b).

5.3.4. Análisis comparativo del proteoma de las cepas analizadas (iTRAQ)

Las proteínas Hfq y Crc son reguladores post-transcripcionales y, aunque tienen una clara influencia sobre el transcriptoma de la célula, su efecto directo es inhibir la traducción de los ARNm, y por tanto reducir los niveles de proteína. Por esta razón se realizó un ensayo de proteómica (usando la aproximación iTRAQ 8-plex) con las mismas estirpes utilizadas en el

ensayo de RNA-Seq, y en las mismas condiciones, es decir, en células creciendo exponencialmente ($0,6 A_{600}$) en medio MMScc.

De los aproximadamente 5350 genes que tiene *P. putida* se analizaron los niveles de 1418 proteínas en el mutante *crc* (KTVC), 1419 proteínas en *hfq* (KT2440 Δ *hfq*) y 1410 proteínas en el mutante doble *hfq crc* (KTHC); considerando que cambiaba su expresión respecto a la de la estirpe wt (KT2440) cuando tenían un *q*-valor $\leq 0,05$ y un cambio en la abundancia de $\pm 1,4$ veces ($\log_2FC \geq |0,49|$). De este filtrado se obtuvo que está afectada la expresión de 10 proteínas en el mutante *crc*, 54 en el mutante *hfq* y 81 proteínas en el mutante doble *hfq crc* (Fig. 25; Tabla S4). Curiosamente, de entre estas proteínas, la mayoría (9 de *crc*, 46 de *hfq* y 61 de *hfq crc*) no corresponden con genes que presenten cambios a nivel de ARN, lo que – descartando el caso de proteínas ribosomales cuyo ARNr fue intencionadamente eliminado durante el protocolo de RNA-Seq para enriquecer las muestras en ARNm – sugiere una regulación post-transcripcional de esos genes.

El número de proteínas cuyos niveles cambiaban en alguno de los mutantes, y que se producen a partir de ARNm que incluyen un motivo CA, fue relativamente bajo (ninguna en el caso del mutante KTVC, 9 en del mutante KT2440 Δ *hfq* y 11 en el mutante doble KTHC; 15 en total; Tabla S4), lo que encaja con el hecho de que las células se cultivaron en una condición en la que la represión catabólica es baja.

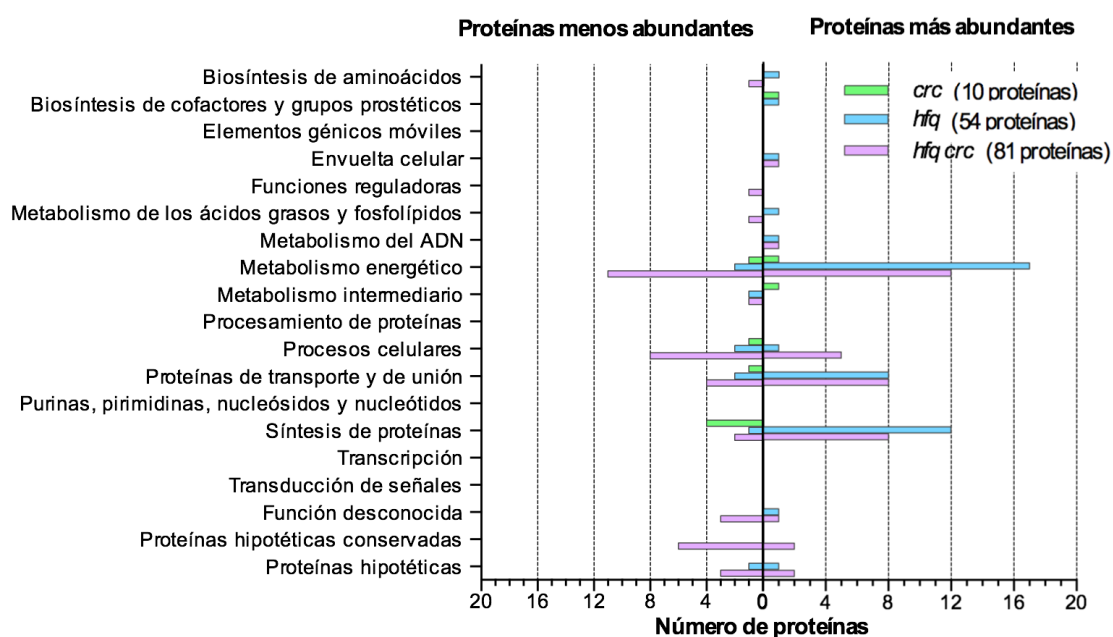


Figura 25 | Proteínas cuya abundancia es mayor o menor en los mutantes *crc* (KTVC, barras verdes), *hfq* (KT2440 Δ *hfq*, barras azules), y en el mutante doble *hfq crc* (KTHC, barras de color lila), respecto al wt KT2440. Los genes aparecen agrupados por categorías funcionales.

La mayoría de los genes que presentan variación en la producción de proteína están agrupados en las siguientes categorías funcionales: síntesis de proteínas (principalmente

proteínas ribosomales), metabolismo energético (sobre todo proteínas relacionadas con el transporte de electrones y el metabolismo de aminoácidos), y proteínas de transporte de unión (mayoritariamente transportadores de aminoácidos) (Fig. 25).

5.3.5. Función de Crc en medio MMSc

El actual modelo de represión catabólica (RC) supone que la proteína Crc no actúa en ausencia de Hfq, *ergo*, los efectos ocasionados por la ausencia de Crc deberían solapar con los efectos ocasionados por la falta de Hfq. Ciertamente, el número de genes cuya expresión cambia es mucho menor en la cepa KTVC (82 genes) que en KT2440 Δ hfq (179 genes) y, además, la mayoría de estos genes tienen cambios de expresión más bajos en el mutante *crc* que en los mutantes *hfq* o *hfq crc*, sugiriendo que la influencia de Crc en estas condiciones (medio MMSc a 0,6 A₆₀₀) es menor que la influencia de Hfq. Sin embargo, sólo un tercio de los genes cuya expresión cambia en el mutante *crc* también están afectados en los mutantes *hfq* y *hfq crc* (28 de 82 genes, Fig. 21), mientras que otro tercio de genes parecen estar alterados en KTVC y en KTHC, pero no en KT2440 Δ hfq (31 de 82 genes, Fig. 21).

Otro aspecto curioso es que los cambios de expresión detectados en el mutante KTVC son menores que los detectados en KT2440 Δ hfq y KTHC, pues si bien los genes cuya expresión varía únicamente en el mutante KT2440 Δ hfq o en el mutante KTHC tienen un cambio medio de $\pm 4,6$ y $\pm 4,8$ veces respectivamente, aquellos genes que se ven afectados en KTVC pero no en KT2440 Δ hfq y KTHC varían $\pm 3,1$ veces de media. Este mismo fenómeno se observa en los 28 genes cuya expresión está alterada en los tres mutantes, presentando un cambio medio de $\pm 7,3$ veces en KT2440 Δ hfq, ± 10 veces en KTHC y solamente $\pm 4,3$ veces en KTVC. Los valores de cambio más bajos en KTVC podrían explicarse por una regulación indirecta, lo cual coincide con el hecho de que la mayoría de los genes afectados en KTVC se expresen menos que en la estirpe silvestre (Fig. 22; Tabla S1), y no más, como se esperaría de aquellos genes que estuvieran inhibidos post-transcripcionalmente por Crc.

De entre los genes cuyo nivel de ARNm se ve incrementado en ausencia de Crc, merece especial atención el operón *dctPQM*, que codifica un transportador de succinato de alta afinidad. Los genes *dctP* y *dctM* contienen un motivo CA de unión a Hfq/Crc, y su represión post-transcripcional por estas proteínas ya ha sido descrita (La Rosa et al., 2015). Sin embargo, en MMSc el único gen con un cambio de ARN superior a ± 3 veces es *dctM*, el último gen del operón. En cualquier caso, el efecto de la posible regulación de *dctPQM* ha de ser bajo, puesto que este transportador es activo a concentraciones micromolares de succinato, mientras que en las concentraciones milimolares de succinato, como las existentes en este caso, el transportador más relevante es DctA (Valentini and Lapouge, 2013), cuya expresión en *P. putida* parece ser independiente de Crc (La Rosa et al., 2015).

Como se comentará en detalle en la discusión, los cambios observados en el mutante *crc* quizás sean debidos a que haya una mayor cantidad de proteína Hfq disponible en esta estirpe, o a la existencia de una hipotética tercera proteína involucrada en el sistema de regulación.

5.3.6. Hfq afecta a la homeostasis del hierro

De los 179 genes cuyos niveles de ARNm están alterados en el mutante KT2440 Δ hfq, 43 corresponden a proteínas hipotéticas o proteínas sin función asignada y 32 a genes asignados a profagos, quedando 104 genes a considerar. De estos 104 genes, 39 de ellos están relacionados con el metabolismo del hierro, 21 son genes relacionados con el transporte y metabolismo de aminoácidos, acetoina u otros compuestos, 13 son componentes de la cadena de transporte de electrones, 6 son genes relacionados con procesos de estrés celular, y 5 pertenecen a genes de envuelta celular, mientras que los 20 genes restantes están asociados a diversas funciones (Fig. 22; Tabla S2).

Tal y como se ha mencionado en la introducción (apartado 2.3), el metabolismo del hierro está estrictamente regulado, ya que este microelemento supone una encrucijada para la célula al ser al mismo tiempo un cofactor indispensable para el correcto funcionamiento de muchas proteínas y también un elemento potencialmente nocivo, pues mediante la reacción de Fenton puede generar especies reactivas de oxígeno al reaccionar con oxígeno o peróxido de hidrógeno.

*Miau**

P. putida KT2440 sintetiza y excreta el sideróforo pioverdina (PVD) como mecanismo para conseguir hierro cuando la disponibilidad del mismo es escasa. Una vez en el medio, la PVD se une a hierro férrico (Fe^{3+}), y esta forma de pioverdina unida a hierro (llamada ferripioverdina, PVD-Fe) es reconocida e introducida en la célula a través de FpvA, un receptor de pioverdina dependiente de TonB, es decir, un receptor que obtiene la energía requerida para la internalización de la PVD-Fe del complejo ExbB-ExbD-TonB. Si bien *P. putida* tiene una única copia de *exbB-exbD-tonB*, presenta alrededor de 25 - 29 receptores dependientes de TonB, así como 13 factores sigma extracitoplásmicos (ECF- σ) diferentes: Pp-ECF σ -2, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -14, -15, -16, -17, -18 y -19 (Cornelis and Matthijs, 2002; Martínez-Bueno et al., 2002). En 11 de los casos el gen que codifica el factor ECF- σ va seguido de un gen que codifica para un factor anti- σ y de otro gen que codifica para un transportador de sideróforo o de hemo; mientras que los dos factores ECF- σ restantes, Pp-ECF σ -4 (denotado como *pvdS* o *pfri*) y Pp-ECF σ -6 (*fpvI*), están localizados en el agrupamiento génico de producción de pioverdina (Martínez-Bueno et al., 2002; Matthijs et al., 2009). En *P. aeruginosa* el factor anti- σ FecR regula la actividad de el factor ECF- σ PvdS, que controla la transcripción de los genes de síntesis de PVD (Ravel and Cornelis, 2003), y Fpvi, que regula la síntesis del receptor de pioverdina FpvA (Cornelis, 2009). Otros factores ECF- σ regulan la producción de determinados receptores dependientes de TonB, como por ejemplo FoxI, que regula al receptor de ferrioxamina, o Fiul, que regula al receptor de ferricromo (Llamas et al., 2006; Cornelis, 2009; Bastiaansen et al., 2015).

Al comparar el nivel de ARNm de estos genes en los mutantes KTVc, KT2440 Δ hfq y KTHC respecto al observado en la estirpe silvestre KT2440, se observa que para la mayoría de ellos la abundancia de estos mensajeros es mayor en ausencia de Hfq, pero no de Crc, tal y como se indica en la tabla 7. La única excepción es el receptor de sideróforos *fpvA*, que

presenta niveles de ARN menores en el mutante *hfq* que en el wt. Así pues, estos datos sugieren que los genes implicados en la captación de PVD-Fe ven incrementada su expresión cuando se inactiva *hfq*.

Por el contrario, los genes implicados en la producción de pioverdina se expresan menos en el mutante *hfq* que la estirpe wt; en la mayoría de los casos este efecto es observable tanto en el mutante KT2440 Δ *hfq* como en el mutante doble KTHC. El primer paso de biosíntesis de PVD tiene lugar en el citoplasma por la acción de las enzimas NRPS (codificadas por los genes *pvdD*, *pvdJ*, *pvdI*, *sydP* y *pvdH*), encargadas de sintetizar ferribactina, el precursor de PVD que es enviado al periplasma por medio de la proteína de membrana PvdE, donde tiene lugar su maduración en pioverdina (por acción de las proteínas codificadas por *pvdM*, *pvdN*, *pvdO* y *pvdP*), y su ulterior secreción al medio externo (mediante la acción del sistema de flujo *ompQ-pvdR-pvdT*) (Fig. 26; Tabla 7).

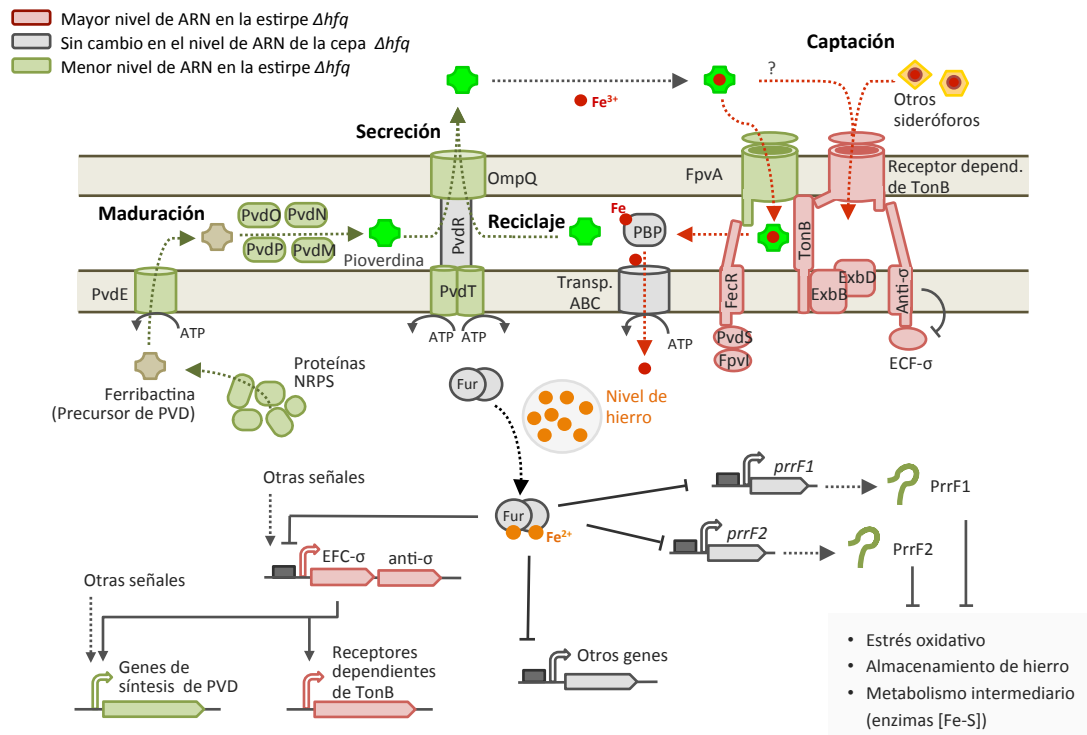


Figura 26 | Representación del efecto de Hfq en la expresión de genes relacionados con la síntesis de pioverdina (PVD) y captación de hierro. Se indican en rojo los genes cuya expresión en MMScc aumenta en ausencia de Hfq y en verde aquellos genes cuya expresión desciende, mostrándose en gris los que no varían (según los datos obtenidos mediante RNA-Seq y RT-qPCR). El diagrama se basa en lo que se sabe de la regulación de la homeostasis del hierro en otras *Pseudomonas* (Cornelis and Matthijs, 2002; Cornelis et al., 2009; Cornelis, 2010; Llamas and Bitter, 2010; Schalk and Guillon, 2013). En el esquema se muestra un perfil general de captación de hierro mediante receptores de sideróforos dependientes de TonB, regulados por el sistema ECF-σ/anti-σ, así como el caso concreto del receptor de PVD FpvA. Curiosamente el receptor FpvA tiene un nivel de ARN más bajo en el mutante *hfq* que en la estirpe wt, en contraposición con el resto de receptores de sideróforos dependiente de TonB.

Quisimos completar la perspectiva incluyendo los resultados del ensayo de proteómica, pero la mayoría de las proteínas vinculadas con la síntesis y captación de sideróforos no fueron detectadas, probablemente debido a su localización celular no citoplásmica. De todos los genes considerados como implicados en la homeostasis del hierro (genes de biosíntesis de PVD, receptores de sideróforos, transportadores ABC, complejo TonB, factores ECF- σ y anti- σ , bacterioferritinas y genes presuntamente implicados en la formación de grupos [Fe-S]), solamente se detectaron proteínas del 24 % de ellos (32 de los 131 genes considerados; Tablas S4 y S5), *ergo* la información potencial del ensayo de proteómica nos resulta muy limitada para el estudio de la regulación de la homeostasis del hierro mediada por Hfq y/o Crc.

Genes de captación de hierro con descenso de expresión		Genes de captación de hierro con aumento de expresión		Captación de hierro / hemo			
PP0272 ⁽¹⁾	Receptor de ferrisideróforo	PP0160 ⁽³⁾	Receptor de sideróforo dep. de TonB, <i>foxA</i>	PP4687 ^(2,3)	Permeasa transp. ABC hemo/hemin, <i>phuV</i>		
PP2901 ^(1,2)	Acilhomoserín lactona acilasa, <i>pvdQ</i>	PP0161 ^(2,3)	Sensor transmembrana, anti- σ , <i>foxR</i>				
PP3555 ⁽²⁾	Sensor transmembrana, anti- σ	PP0267 ^(2,3)	Receptor de ferrisideróforo				
PP3796 ^(1,2,3)	L-oritina N5-oxigenasa, <i>pvdA</i>	PP0351 ^(2,3)	Sensor transmembrana, anti- σ , <i>fiuR</i>				
PP3797 ⁽³⁾	Probable proteína de síntesis de PVD, <i>fpvG</i>	PP0352 ⁽²⁾	Factor sigma ECF-7, <i>fiuI</i>	PP4688 ^(2,3)	Transp. ABC de hemo/hemin de unión a sustrato, <i>phuU</i>		
PP3798 ^(2,3)	Probable proteína de síntesis de PVD, <i>fpvH</i>	PP0668 ^(2,3)	Sensor transmembrana, anti- σ				
PP3799 ^(2,3)	Probable proteína de síntesis de PVD, <i>fpvJ</i>	PP0667 ⁽³⁾	Factor sigma ECF-15	PP4264 ^(2,3)	Coproporfirinógeno III desh. independiente de oxígeno		
PP3800 ^(2,3)	Probable proteína de síntesis de PVD, <i>fpvK</i>	PP0700 ⁽³⁾	Sensor transmembrana, anti- σ				
PP3801 ^(2,3)	Transp. ABC de cationes, probable <i>fpvC</i>	PP0703 ⁽³⁾	Sensor transmembrana, anti- σ	Almacenamiento de hierro			
PP3802 ^(2,3)	Transp. ABC de cationes, probable <i>fpvD</i>	PP0704 ⁽³⁾	Factor sigma ECF-16				
PP3803 ^(2,3)	Transp. ABC de cationes, probable <i>fpvE</i>	PP0861 ^(2,3)	Receptor de ferrisideróforo	PP0482 ^(2,3)	Bacterioferritina, <i>bfrA</i>		
PP3804 ^(2,3)	Transp. de iones metálicos, probable <i>fpvF</i>	PP2192 ⁽³⁾	Factor sigma ECF-19, <i>iutY</i>				
PP4210 ⁽¹⁾	Sistema ABC de transporte de PVD, <i>pvdT</i>	PP2193 ⁽³⁾	Receptor de ferrisideróforo, <i>iutA</i>			PP1082 ^(2,3)	Bacterioferritina, <i>bfrB</i>
PP4211 ^(1,3)	Proteína de eflujo de pioverdina, <i>ompQ</i>	PP3084 ^(2,3)	Receptor de ferrisideróforo				
PP4212 ^(1,3)	Proteína de biosíntesis de pioverdina, <i>pvdP</i>	PP3085 ⁽³⁾	Sensor transmembrana, anti- σ	PP1083 ⁽³⁾	Ferreodoxina asociada a bacterioferritina		
PP4213 ⁽³⁾	Dipeptidasa, <i>pvdM</i>	PP3086 ⁽³⁾	Factor sigma ECF-9				
PP4214 ^(1,3)	Proteína de biosíntesis de PVD, <i>pvdN</i>	PP3155 ^(2,3)	Receptor de ferrisideróforo	<div>Red: Más nivel de ARN que en el wt</div> <div>Green: Menos nivel de ARN que en el wt</div> <div>(1) En el mutante <i>crc</i>.</div> <div>(2) En el mutante <i>hfq</i>.</div> <div>(3) En el mutante doble <i>hfq crc</i>.</div> <div>(*) Cambio incluido tras confirmación mediante RT-qPCR</div>			
PP4215 ^(1,2,3)	Proteína de biosíntesis de PVD, <i>pvdO</i>	PP3612 ^(2,3)	Receptor dependiente de TonB				
PP4216 ^(1,2,3)	Sistema ABC de transporte de PVD, <i>pvdE</i>	PP4208 ^(2,3)	Factor sigma ECF-6, <i>fpvI</i>				
PP4217 ^(2,3)	Receptor de ferripioverdina, <i>fpvA</i>	PP4244 ^(2*,3)	Factor sigma ECF-4, <i>pvdS</i> o <i>pfri</i>				
PP4218 ^(1,2*,3)	Proteína de la familia de lipasa/esterasa	PP4607 ^(2,3)	Sensor transmembrana, anti- σ				
PP4219 ^(1,2,3)	Péptido sintetasa no ribosomal, <i>pvdD</i>	PP4608 ^(2,3)	Factor sigma ECF-5				
PP4220 ^(1,2,3)	Péptido sintetasa no ribosomal, <i>pvdJ</i>	PP4611 ⁽³⁾	Factor sigma ECF-2, <i>fecI</i>				
PP4221 ^(1,2,3)	Péptido sintetasa no ribosomal, <i>pvdI</i>	PP4612 ⁽³⁾	Regulador anti- σ FecR				
PP4222 ^(1,2,3)	Péptido sintetasa no ribosomal, <i>syrP</i>	PP5196 ^(2,3)	Transp. ABC de hierro, <i>fbpA</i>				
PP4223 ^(1,2,3)	Diaminobutirato-2-oxoglut. transam., <i>pvdH</i>	PP5308 ^(2,3)	Complejo TonB, <i>tonB</i>				
PP4243 ^(1,2,3)	Péptido sintetasa no ribosomal, <i>pvdL</i>	PP5307 ^(1,2,3)	Complejo TonB, <i>exbD</i>				
PP4245 ^(1,2*,3)	Hydroxiprolina acetilasa, <i>pvdY</i>	PP5306 ^(2,3)	Complejo TonB, <i>exbB</i>				

Tabla 7 | Genes relacionados con la homeostasis del hierro (síntesis, salida y captación de sideróforos y almacenamiento de hierro) que sufren un incremento (en rojo) o un descenso de expresión (en verde) en los mutantes KTVC (indicado como 1), KT2440 Δ *hfq* (indicado como 2) y/o KTHC (indicado como 3) respecto a la estirpe silvestre. Información adaptada de Martínez-Bueno et al., 2002; Ravel and Cornelis, 2003; Matthijs et al., 2009; Gross and Looper, 2009; Cornelis, 2009.

La imagen general de partida proporcionada por estos datos (Fig. 26; Tabla 7) apunta a que la ausencia de Hfq desregula la homeostasis del hierro, afectando por un lado a la producción y expulsión de pioverdina, que se ve reducida tanto en el mutante KTVC como, en mayor medida, en el mutante KT2440 Δ *hfq*, y también de genes implicados en la captación de hierro, que en el mutante KT2440 Δ *hfq* está incrementada. Esto sugiere que Hfq regula la homeostasis del hierro. Con el fin de verificar dicha hipótesis se han realizado una serie de ensayos que se detallan a continuación.

5.3.6.1. Hfq afecta a la producción de pioverdina

Iniciamos nuestro trabajo sobre la implicación de Hfq y Crc en la regulación del metabolismo del hierro comprobando si el descenso de expresión observado en los genes de biosíntesis de pioverdina (PVD) en los mutantes *hfq* y *crc*, tenía consecuencias fenotípicas detectables en términos de PVD producida. Al contrario de lo que ocurre en otras bacterias como *P. aeruginosa*, la producción de PVD en un cultivo de *P. putida* crecido en matraz es difícilmente visible, y la coloración amarillo/verdosa característica de la PVD sólo se aprecia en fases muy tardías del crecimiento (cultivos de 10 h o más, datos no mostrados). No obstante, la PVD, pero no su precursor, es una molécula fluorescente, con un máximo de excitación a 460 nm y de emisión a 405 nm, característica de la que nos hemos servido para, siguiendo las indicaciones de trabajos previos, estimar la producción de PVD (Baysse et al., 2001).

Los ensayos de RNA-Seq se habían hecho con células crecidas en un medio con alta cantidad de hierro, en el que la secreción de PVD debe ser baja. Medimos el contenido en hierro de este medio mediante ICP-MS (Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente), resultando un valor de $84,52 \pm 2,60 \mu\text{M}$ de hierro (Fig. 30a). Para tener una condición que forzara a la célula a producir PVD, modificamos este medio sustituyendo el Fe_2SO_4 por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en la misma concentración, obteniendo un medio en el que el hierro pasó a estar a una concentración de $0,3 \pm 0,02 \mu\text{M}$; a este medio bajo en hierro lo hemos denominado MMlowFe. También determinamos cuál era la cantidad de hierro en el medio LB de uso común en el laboratorio, siendo ésta de $6,11 \pm 0,60 \mu\text{M}$, y en un medio mínimo control designado como “MM2 μMFe ” que consistía en medio MMlowFe suplementado con $2 \mu\text{M}$ de FeCl_3 , en el que se ha estimado que hay $2,77 \pm 0,46 \mu\text{M}$ de hierro (Fig. 30a). Esta información nos resulta muy útil puesto que, además de comprobar que el medio LB del que disponemos tiene una concentración de hierro similar a la descrita por otros autores ($4 \mu\text{M}$; Cunrath et al., 2015; Schalk and Cunrath 2016), nos confirma que la técnica ICP-MS funciona correctamente, ya que la suplementación de hierro en el medio MM2 μMFe da por resultado los valores esperados. Por otro lado, estos datos nos permiten concluir que el medio mínimo empleado en el ensayo de transcriptómica, MMScc, es un medio en el que el hierro está a una concentración no limitante (Molina et al., 2005). Esta concentración elevada de hierro, así como de otros metales, se debe a que este medio mínimo fue diseñado originalmente para ensayos de biodegradación de compuestos aromáticos, cuyo catabolismo requiere de muchos enzimas que necesitan cofactores metálicos.

Al medir la cantidad de PVD producida por las células cuando se cultivan en los medios MMScc y MMlowFe se aprecia una clara relación entre la señal de fluorescencia producida por la estirpe wt (KT2440) y el nivel de hierro presente en el medio, siendo la señal de fluorescencia más alta cuando hay baja cantidad de hierro en el medio (Fig. 27). También se observa que, si bien la señal de fluorescencia del mutante *crc* es equivalente a la detectada en la cepa parental, no ocurre lo mismo en los mutantes *hfq* y *hfq crc*, en los que se distingue un claro descenso de la señal de fluorescencia. Esto nos indica que los mutantes en *hfq* producen menos PVD, tanto en condición de alta (MMScc highFe; Fig. 27b) como baja disponibilidad de hierro (MMlowFe; Fig. 27a).

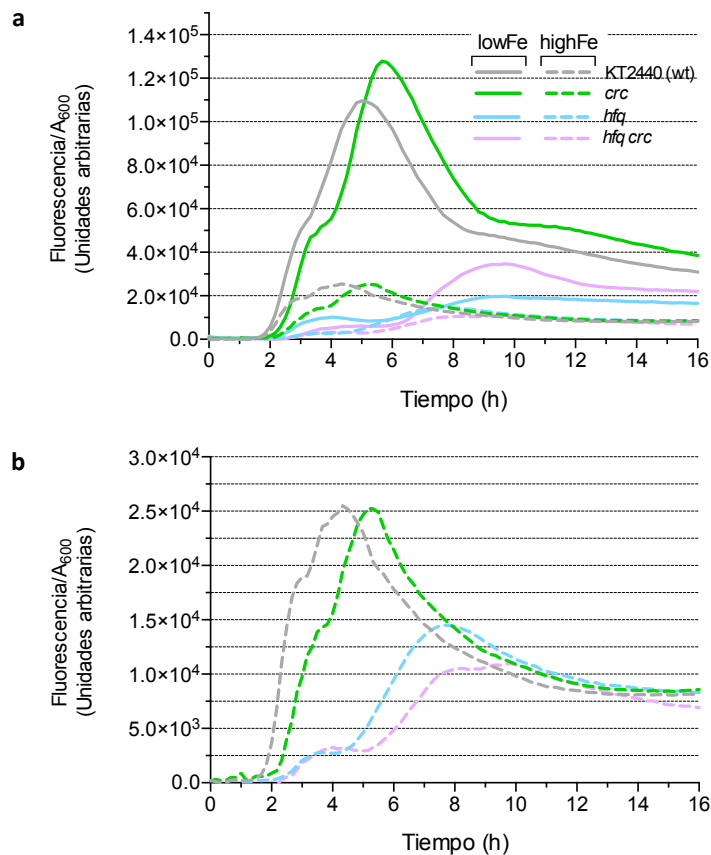


Figura 27 | Influencia de las proteínas Hfq y Crc en la producción de pioverdina en condiciones de alta disponibilidad de hierro (MMScc, 84,5 μ M Fe, con líneas discontinuas), o de escasez de hierro (MMlowFe, 0,3 μ M Fe, con líneas continuas). **(a)** La producción de PVD se calculó midiendo la fluorescencia que ésta emite (excitación a A₄₆₀ y emisión a A₄₀₅) y normalizando este valor respecto al a cantidad de células (A₆₀₀) a lo largo de la curva de crecimiento. La figura corresponde a la media de dos experimentos independientes con triplicados técnicos en cada uno de ellos. **(b)** Imagen ampliada de la fluorescencia observada en el medio con alto contenido de hierro.

Se obtiene un resultado similar si se analiza la producción de pioverdina (PVD) en medio sólido (1,5 % de agar) y con el quelante de hierro 2,2-bipiridilo (2,2-BP; Watson et al., 2010) a una concentración que atrapa casi todo el hierro disponible. En medio MMScc, con alta disponibilidad de hierro, ninguna de las estirpes analizadas produce niveles de PVD detectables a simple vista. Sin embargo, cuando se añade 1,2 mM de 2,2-BP, las estirpes KT2440 (wt) y KTVC (*crc*) presentan un halo amarillo/verdoso correspondiente a la producción de pioverdina, el cual apenas es visible en los mutantes *hfq* (estirpes KT2440 Δ *hfq* y KTHC) (Fig. 28). Con concentraciones mayores de 2,2-BP los mutantes en *hfq* no crecen adecuadamente, probablemente porque no son capaces producir suficiente PVD como para extraer del medio el hierro que necesitan.

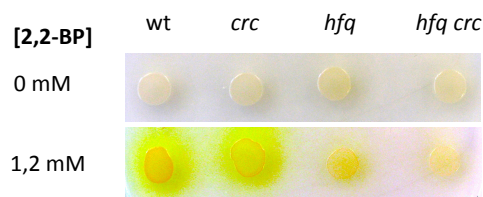


Figura 28 | Producción de pioverdina (PVD) en las estirpes *P. putida* KT2440 (wt), KTVC (*crc*), KT2440Δ*hfq* (*hfq*) y KTHC (*hfq crc*) en placas de agar MMScC. Se ha comparado la producción de PVD en placas de MMScC con 84,5 μM de hierro (arriba) y en esas mismas placas con 1,2 mM del quelante de hierro 2,2-bipiridilo (2,2-BP, abajo).

Cuando se complementó el mutante KT2440Δ*hfq* con el plásmido pHFQ, que porta el gen *hfq* bajo el control de su propio promotor *Phfq*, el mutante recuperó una producción de pioverdina (PVD) similar a la observada en la estirpe parental KT2440, tanto en medio líquido (MMlowFe; Fig. 29a y 29b) como en medio sólido (MMScC con 1,2 mM de 2,2-BP; Fig. 29c), confirmando así que el fenotipo observado en la estirpe KT2440Δ*hfq* está provocado por la ausencia de Hfq.

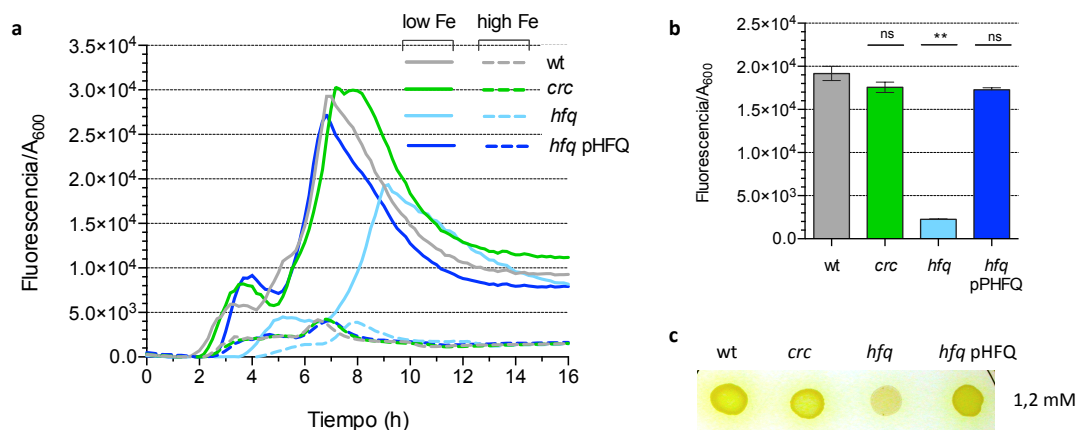


Figura 29 | Producción de PVD en las estirpes *P. putida* KT2440 (wt), KTVC (*crc*), KT2440Δ*hfq* (*hfq*) y KT2440Δ*hfq* complementada con el plásmido pHFQ (*hfq pHFQ*). **(a)** Análisis de la producción de fluorescencia en medio mínimo MMhighFe (84,5 μM Fe; líneas discontinuas) y MMlowFe (0,3 μM Fe; líneas continuas). **(b)** Mediante ANOVA se comparó el valor de fluorescencia/A₆₀₀ en las diferentes estirpes a las 7 horas de crecimiento en MMlowFe (**, *p*-valor < 0,01; ns, no significativo) **(c)** Análisis de la producción de PVD en placas de MMhighFe con 1,2 mM del quelante de hierro 2,2-bipiridilo (2,2-BP).

5.3.6.2. Comparación de los niveles de hierro intracelular

Al percatarnos de que la inactivación de *hfq* alteraba la expresión de multitud de genes implicados en la homeostasis del hierro, así como la producción del sideróforo pioverdina, quisimos comprobar si esto tenía consecuencias en la cantidad de hierro intracelular presente en las diferentes estirpes estudiadas.

Observamos que la ausencia de Hfq y/o Crc no tiene efecto en la concentración intracelular de hierro, ni en condiciones de abundancia ni de carencia del microelemento (Fig. 30b), y que las bacterias tienden a acumular hierro en el interior celular, concentrándolo. Esta acumulación de metales, no sólo de hierro, conocida como “factor de concentración”, se ha descrito previamente y está relacionada con la eficiencia con la que la bacteria capta cada metal, así como con la disponibilidad de dicho metal en el medio. (Cunrath et al., 2015; Schalk and Cunrath 2016). Nosotros observamos un factor de concentración de menos de 2 veces, menor que al previamente descrito.

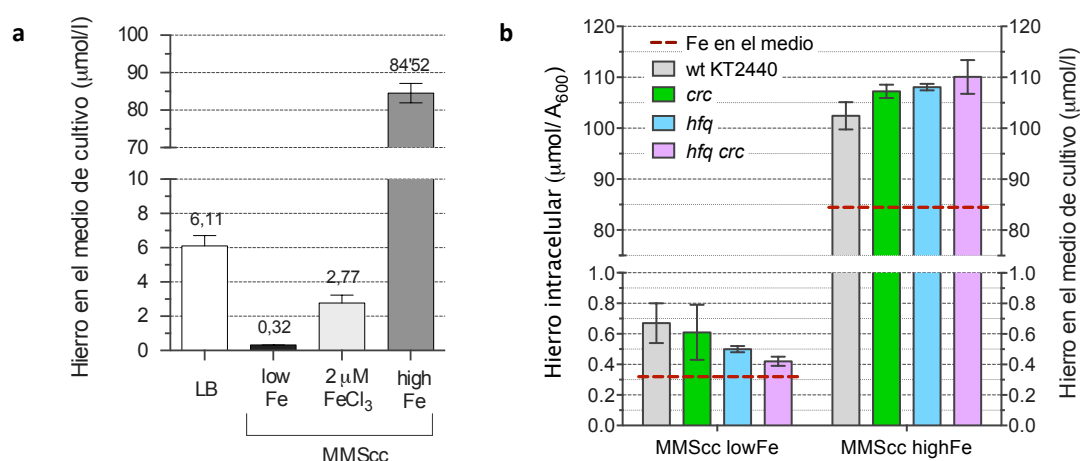


Figura 30 | Estimación de la concentración de hierro mediante ICP-MS en los medios de trabajo y en el interior celular. **(a)** Se determinó la concentración de hierro en medio LB y en medio mínimo con succinato en tres condiciones: en medio MMLowFe (MMScc modificado sustituyendo el Fe_2SO_4 por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a la misma concentración), en medio MMLowFe suplementado con 2 μM de FeCl_3 (indicado como 2 μM FeCl_3) y en el medio MMScc no modificado (aquí referido como MMScc highFe). La concentración de hierro determinada para cada muestra está indicada numéricamente sobre las columnas. **(b)** Estimación de la cantidad intracelular de hierro (columnas) referida a la concentración de hierro observada en los respectivos medios de cultivo (líneas de puntos) donde fueron crecidas las bacterias. En el caso de la concentración de hierro en el interior celular, los valores de ^{56}Fe obtenidos fueron normalizados respecto a la A_{600} de cada cultivo. Los datos corresponden a la media \pm SD de duplicados independientes en el caso de las concentraciones intracelulares, y de triplicados independientes en el caso de la medición de la concentración en el medio líquido.

5.3.6.3. Estudio de la influencia de Hfq y Crc sobre la expresión del complejo TonB

La observación de que la inactivación de *hfq* conduce a una menor producción de PVD sin afectar a la concentración intracelular de hierro, indica que la célula ha encontrado una manera de compensar la disminución de pioverdina, quizás aumentando su captación, como

sugiere el hecho de que hasta 30 genes implicados en la adquisición de hierro tengan niveles de ARN mayores en el mutante *hfq* (Tabla 7; Tabla S2). Entre estos genes se incluyen los genes del operón *exbB-exbD-tonB*, que codifican el complejo TonB, encargado de proporcionar la energía protón motriz necesaria para la internalización de la ferripioverdina (PVD-Fe). Los ARNm de los genes *exbB* y *tonB* contienen motivos CA en su extremo 5', lo que les convierte en posibles candidatos de la regulación post-transcripcional conjunta de Hfq y Crc. Esta posibilidad se estudió usando la fusión traduccional *PexbB'-lacZ*, que incluye 200 bp correspondientes al promotor *PexbB* clonadas en fase con el gen reportero *lacZ* en el vector pSEVA225T.

Al analizar la actividad β -galactosidasa de la fusión *PexbB'-lacZ* comprobamos que la disponibilidad de hierro parece afectar poco a la expresión desde *PexbB*, lo cual puede deberse a que el complejo TonB no sólo está implicado en el transporte y captación de hierro, sino también de otros metales como cobre o zinc (Schalk and Cunrath, 2016), que en nuestro medio mínimo se encuentran en cantidades mucho menores que descritas para el hierro (alrededor de 1,2 μ M según los cálculos), y cuya regulación no hemos estudiado.

En cuanto al efecto de *crc* y/o *hfq* se observa que la actividad β -galactosidasa de *PexbB'-lacZ* efectivamente se ve incrementada en KT2440 Δ *hfq* y el doble mutante KTHC (Fig. 31), apoyando la hipótesis de un incremento de la captación de PVD-Fe en los mutantes *hfq*. Se trata, sin embargo, de un cambio moderado (un incremento de ~ 2 veces), y que con esta fusión traduccional únicamente se aprecia en condiciones con deficiencia de hierro (MMlowFe), y no en el medio MMScc highFe donde se llevó a cabo el ensayo RNA-Seq.

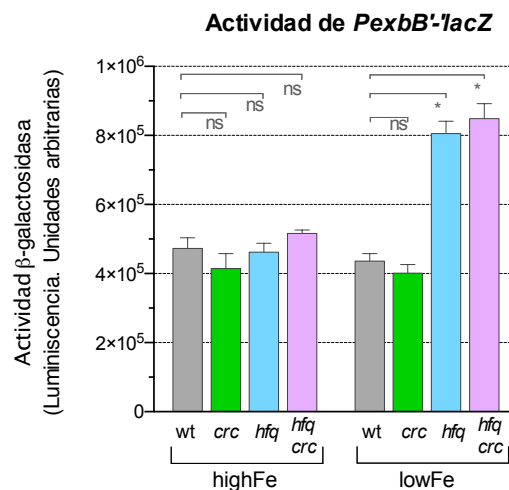


Figura 31 | Efecto de la inactivación de *crc* y/o *hfq*, y de la disponibilidad de hierro, en la actividad de la fusión traduccional *PexbB'-lacZ*. Se ha comparado la actividad β -galactosidasa de la fusión traduccional *PexbB'-lacZ* en las estirpes KT2440 (wt, en gris), KTVC (*crc*, en verde), KT2440 Δ *hfq* (*hfq*, en azul) y KTHC (*hfq crc*, en lila) en medio MMScc de alta disponibilidad de hierro (84,5 μ M) y en medio MMlowFe con escasez de hierro (0,3 μ M). Los datos corresponden a la media \pm SD de triplicados, realizados en fase estacionaria (1,5 A₆₀₀). Los datos se compararon mediante ANOVA, indicando en la figura qué cambios son significativos (*; *p*-valor < 0,1), y cuáles no (ns).

La ausencia de Crc parece tener poco o ningún efecto sobre la actividad de la fusión *PexbB'-lacZ* (Fig. 31), cosa que se ha visto en algunos otros casos en los que el efecto de Crc es pequeño en comparación con el de Hfq, como por ejemplo en el ARN *amiE* (Sonnleitner and Bläsi, 2014). Cabe señalar además, que los motivos CA presentes en los ARNm de *exbB* y *tonB* se localizan algo lejos de los inicios de traducción de estos genes, 89 nt y 58 nt respectivamente. Aunque no se ha determinado a qué distancia del AUG deben hallarse los dominios CA para ser activos, sí es cierto que en aquellos casos en los que la interacción con Hfq y Crc ha sido probada, éstos se localizan cerca del sitio de unión al ribosoma (RBS, del inglés *Ribosome binding site*) o bien en los nucleótidos posteriores al AUG, probablemente afectando a la elongación (Fig. 32).

CA-cons:	AANAANAANAA	
<i>exbB</i> CA:	AACAAGAA	(89 nt) AUG
<i>tonB</i> CA:	AACAAGAU	(58 nt) AUG
<i>benR</i> CA:	AACAUAUA	(20 nt) AUG
<i>benA</i> CA:	AACAUAACAA	(14 nt) AUG
<i>benF</i> CA:	AAAAACAA	(17 nt) AUG
<i>phaC1</i> CA:		AUG (3 nt) AACAGAACAA
<i>alkS</i> CA:		AUG (2 nt) AAUAAUAUA
CA-cons:	AANAANAANAA	

Figura 32 | Comparación de la secuencia consenso del motivo CA (CA-cons) con los motivos CA presentes en los genes *tonB*, *exbB* y otros genes para los cuales ha sido demostrado el efecto de Crc. Se muestran en verde los nucleótidos del motivo CA que corresponden con la secuencia consenso y en negro los que no coinciden. Entre paréntesis se indica el número de nucleótidos que separan el motivo CA del AUG del gen, mostrándolo a la izquierda o a la derecha del AUG en función de que se sitúe antes o después del inicio de traducción de dicho gen.

5.3.6.4. Influencia de Hfq y Crc en la expresión y niveles de los ARNp PrrF1 y PrrF2

La regulación de la homeostasis del hierro en las bacterias del género *Pseudomonas* tiene varios elementos, entre los que destacan la proteína reguladora Fur y los ARN pequeños (ARNp) PrrF1 y PrrF2. Se sabe que la actividad de la proteína reguladora Fur depende directamente de la cantidad de hierro intracelular, la cual hemos visto que no varía entre nuestras estirpes de estudio cuando se inactivan los genes *crc* o *hfq*. Se ha descrito que en *E. coli* la ausencia de Hfq compromete la abundancia de transcrito *fur* (Vecerek et al., 2003), pero en nuestros datos de transcriptómica y proteómica no se observa variación de *fur* ni a nivel de transcrito (Tabla S2) ni a nivel de proteína (Tabla S4). Tras comprobar mediante RT-qPCR que, en nuestras condiciones de estudio, los niveles de *fur* no se veían afectados por la ausencia de Hfq o Crc (Tabla 6), centramos nuestra atención en los ARNp PrrF1 y PrrF2.

En *E. coli* Hfq es una chaperona de ARN que facilita el apareamiento de muchos ARNp con sus ARNm diana, al tiempo que los protege de la degradación por la RNasa E (Massé et al., 2003). Entre estos ARNp se incluye RyhB, implicado en la homeostasis del hierro en esta especie bacteriana. Aunque se sabe que los ARNp PrrF1 y PrrF2 de *Pseudomonas* cumplen una función análoga a RyhB de *E. coli*, el posible efecto que la proteína Hfq pueda tener sobre ellos no ha sido estudiado hasta la fecha.

En *P. aeruginosa*, PrrF1 y PrrF2 se localizan en tándem, pudiendo transcribirse de forma independiente y también como un único transcrito que genera un tercer ARNp llamado PrrH, que incluye las secuencias de *prfF1* y *prfF2*, así como la zona intergénica entre ambos. Utilizando ensayos de transcriptómica se ha descrito que, en *P. putida*, los ARNp PrrF1 y PrrF2 están en las regiones intergénicas posteriores a los genes PP4069 y PP4685 respectivamente, con un tamaño aproximado de 92 nt en el caso de PrrF1 y de 144 nt en el caso de PrrF2, según las estimaciones realizadas mediante RNA-Seq, una técnica que no permite determinar la longitud de los transcritos con exactitud (D'Arrigo et al., 2016). Por lo tanto, en *P. putida*, PrrF1 y PrrF2 están localizados en sitios diferentes del genoma y el ARNp PrrH no existe.

Para localizar los inicios de transcripción exactos de PrrF1 y PrrF2 se realizó un ensayo de extensión del cebador (*primer extension*) a partir de oligonucleótidos específicos (PE-PrrF1inv y PE-PrrF2inv). Dichos inicios de transcripción, precedidos por claras cajas -35 y -10 para la σ^{70} -ARNpol, están localizados 15 nt después del inicio previamente propuesto para PrrF1 (D'Arrigo et al., 2016), y 67 nt después del descrito en el caso de PrrF2 (Fig. 33a, b, c). Si estos datos se combinan con la estimación de terminadores de transcripción mediante el uso de la herramienta web ARNold (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/>, Naville et al., 2011) se puede otorgar un tamaño de 116 nt a PrrF1 y 114 nt a PrrF2; el mismo tamaño que presentan en *P. aeruginosa*, lo que implica una alta similitud tanto en tamaño como en secuencia entre los dos ARNp. Mediante la herramienta web Virtual Footprint (<http://www.prodoric.de/vfp/>; Münch et al., 2005) se localizaron en los promotores de ambos ARNp sendas cajas Fur de 19 nt (Fig. 33d), con una semejanza respectiva de 12 nt y 15 nt respecto a la secuencia consenso para la unión de Fur previamente descrita para bacterias Gram negativas (Escolar et al., 1999).

Debido a su pequeño tamaño y a la metodología usada, los ARNp PrrF1 y PrrF2 no fueron detectados en los ensayos de RNA-Seq, por lo que su abundancia se estudió mediante Northern Blot. A partir del vector pSPT18, y mediante transcripción *in vitro*, se construyeron dos sondas de ARN diferentes, la llamada sonda PrrF1 que hibrida en las posiciones -17 a 80 de dicho ARNp, y la denominada sonda PrrF2 que hibrida en las posiciones -35 a 78 de PrrF2. Como control de carga se usó una sonda para el ARNr 5S, de 120 nt de tamaño. Estas sondas se usaron en ensayos de Northern realizados con muestras de ARN de las estirpes wt (KT2440), *crc* (KTVC), *hfq* (KT2440 Δ *hfq*) y *hfq crc* (KTHC), crecidas hasta fase exponencial (0,6 A₆₀₀) en medios MMScc con alta (84,5 μ M) o baja (0,3 μ M) cantidad de hierro, referidos como H y L respectivamente. Tanto al hibridar las muestras de ARN con la sonda PrrF1 (Fig. 34a) como cuando se usó la sonda PrrF2 (Fig. 34b), solo se detectó una banda de aproximadamente ~100 nt (algo menor que el ARNr 5S). Además, dicha banda se detecta únicamente en medio mínimo con baja cantidad de hierro (L), lo que encaja con el modelo de regulación de PrrF1 y PrrF2

propuesto para *P. aeruginosa* según el cual, en condiciones de alta disponibilidad de hierro la proteína Fur inhibe la transcripción de *prrF1* y *prrF2*. Estos datos sugieren que debido a la elevada similitud en tamaño y secuencia que presentan los ARNp PrrF1 y PrrF2 no es posible detectarlos de forma individual ni diferenciarlos con las sondas empleadas.

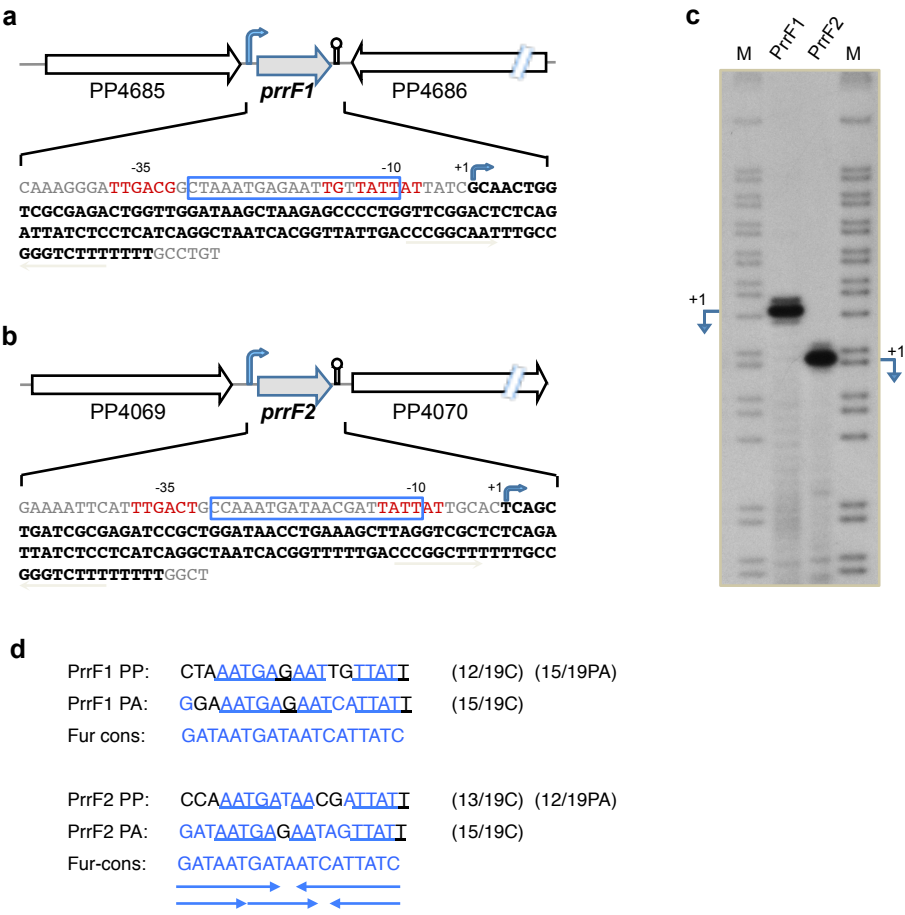


Figura 33 | Determinación del inicio de transcripción de *prrF1* y *prrF2*, y organización de su región promotora. **(a, b)** Región promotora y secuencia de *prrF1* y *prrF2*. Las cajas -35 y -10 de los promotores están indicadas con letras rojas mientras que la caja Fur se encuentra encuadrada en un rectángulo azul. Así mismo, la secuencia de los ARNp se ha resaltado con letras en negrita, y el +1 de transcripción determinado mediante *primer extension* se indica con una flecha. **(c)** Resultado del ensayo de *primer extension* empleado para determinar el origen de transcripción de *prrF1* y *prrF2*. La escalera de secuencia se obtuvo a partir de una región de ~290 pb de *prrF1*, amplificada usando los oligonucleótidos PE-PrrF1 dir y PE-PrrF1 inv. **(d)** Similitud de las supuestas cajas Fur de los promotores de *prrF1* y *prrF2* de *P. putida* (PP), con los promotores equivalentes de *P. aeruginosa* (PA), y con la secuencia consenso de 19 nucleótidos descrita para bacterias Gram negativas (Fur-cons; Escolar et al., 1999). Se muestra en azul aquellos nucleótidos idénticos entre las secuencias de PP o de PA y la secuencia consenso, y subrayados los nucleótidos iguales entre los promotores de PP y PA. Al final y entre paréntesis se indican el número de nt equivalentes en cada caso. Las flechas inferiores corresponden a las repeticiones inversas / directas propuestas por Escolar et al. (1999) para la secuencia consenso.

Al comparar el nivel de PrrF1 y PrrF2 detectado por Northern Blot en las diferentes estirpes, se constata que la ausencia de Crc no altera la abundancia de PrrF1 y/o PrrF2 (PrrF1-F2), mientras que en ausencia de Hfq (KT2440 Δ hfq y KTHC) la abundancia de estos ARNp es unas tres veces menor que en la estirpe silvestre (Fig. 34c).

En *E. coli* se ha descrito que el ARNp RyhB, el homólogo de PrrF1 y PrrF2, interacciona con Hfq y la RNasa E para degradar el transcrito *sodB* (Morita et al., 2005). A fin de comprobar el efecto que la ausencia de Hfq tiene sobre la funcionalidad de los ARNp PrrF1 y PrrF2 en *P. putida*, se midieron, mediante RT-qPCR, los niveles del transcrito de *sodB* en la estirpe silvestre *P. putida* KT2440, en medio MMhighFe y en MMlowFe, confirmando que la abundancia de *sodB* se incrementa 8 veces en presencia de hierro. Al comparar los niveles de *sodB* en los mutantes *hfq* y/o *crc*, se confirmó que aunque la ausencia de Crc apenas afecta a la funcionalidad de PrrF1 y PrrF2 (en KTVC la expresión de *sodB* es de $-1,7 \pm 0,5$ respecto a la de la estirpe parental), los mutantes *hfq* y *hfq crc*, en los que se ha comprobado que hay menos PrrF1 y PrrF2, presentan mayor nivel de transcrito *sodB* ($4,8 \pm 0,4$ veces más en KT2440 Δ hfq y $5,1 \pm 1,4$ veces más en KTHC respecto la estirpe silvestre KT2440).

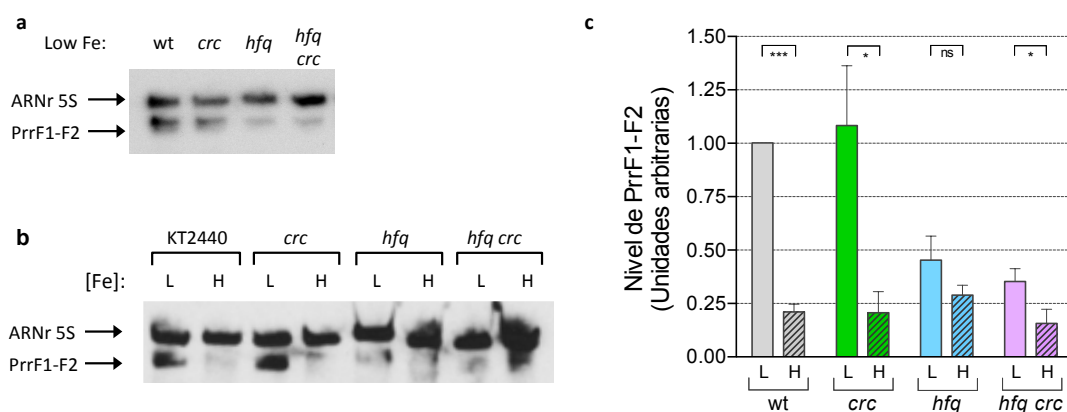


Figura 34 | Detección de PrrF1 y/o PrrF2 (PrrF1-F2) mediante Northern Blot. **(a)** El ensayo se realizó en condiciones de bajo hierro (MMlowFe; 0,3 μ M de Fe) usando las sondas PrrF1 y 5S ARNr, **(b)** y también en condiciones de bajo (L; MMlowFe) y alto hierro (H; MMScc highFe con 84,5 μ M de Fe) usando las sondas PrrF2 y 5S ARNr. **(c)** Comparación de la abundancia de PrrF1-F2 en bajo (L) y alto hierro (H) usando la sonda PrrF2. Los niveles de PrrF1-F2 detectados se normalizaron respecto al ARNr 5S, y se cuantificaron de forma relativa tomando como referencia (cantidad arbitraria de 1 U) el nivel de PrrF1-F2 en la cepa parental KT2440 en condiciones de bajo hierro (L). Los datos corresponden a la media \pm SD de tres réplicas independientes.

Tras confirmar que la inactivación de *hfq* conlleva un descenso de la abundancia de PrrF1 y/o PrrF2, quisimos examinar si se trataba de un efecto transcripcional o post-transcripcional. Utilizando los cebadores Pprf1-fw + Pprf1-rv y Pprf2B-fw + Pprf2-rv se construyeron sendas fusiones transcripcionales de los promotores *Pprf1* y *Pprf2* al gen

reportero *lacZ* en el vector pSEVA225. Los plásmidos con las fusiones *PprfF1-lacZ* y *PprfF2-lacZ* se transformaron mediante electroporación en las cepas KT2440, KTVC, KT2440 Δ *hfq* y KTHC, y posteriormente se midió su actividad β -galactosidasa a lo largo del tiempo cuando las bacterias crecían en un medio mínimo con succinato como única fuente de carbono y con alta (medio MMScc) o baja (medio MMlowFe) disponibilidad de hierro, a fin de comprobar la influencia del hierro y de la inactivación de *hfq* y/o *crc* en la actividad de los promotores *PprfF1* y *PprfF2*. Los datos obtenidos muestran que, si bien el nivel de expresión desde ambos promotores aumenta cuando la disponibilidad de hierro baja, este cambio es más evidente en el promotor *PprfF2*, cuya actividad se reduce del orden de 4 veces cuando en el medio hay una alta concentración de hierro, respecto al medio bajo en hierro (Fig. 35b). Se observa también que ni la ausencia de Crc (mutante KTVC en verde) ni la de Hfq (mutante KT2440 Δ *hfq* en azul y mutante doble KTHC en lila) modifican la actividad de los promotores *PprfF1* y *PprfF2* (Fig. 35c, d), sugiriendo que el efecto de Hfq sobre los ARNp PrrF1 y PrrF2 es post-transcripcional.

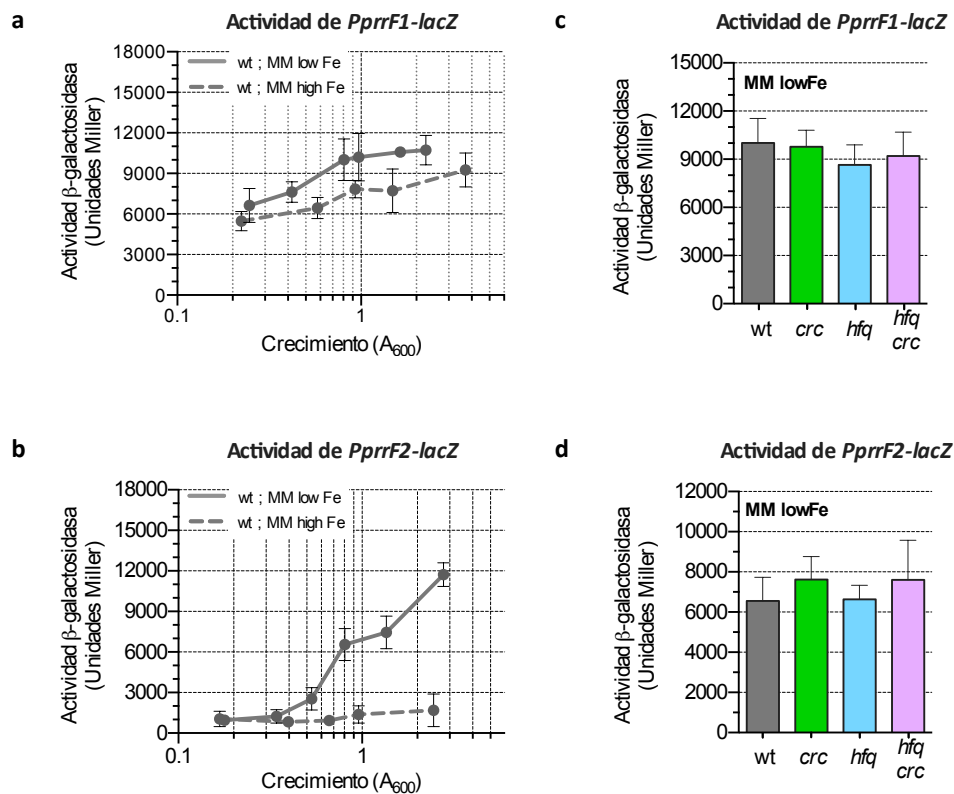


Figura 35 | Efecto de la abundancia de hierro y de la ausencia de Crc y/o Hfq sobre la actividad de las fusiones *PprfF1-lacZ* y *PprfF2-lacZ*. **(a, b)** Actividad β -galactosidasa de las fusiones *PprfF1-lacZ* y *PprfF2-lacZ* en *P. putida* KT2440 creciendo en MMScc con abundancia de hierro (84,5 μ M, en líneas discontinuas) y en medio MMlowFe con escasez de hierro (0,3 μ M, en líneas continuas). **(c, d)** Comparación de la actividad β -galactosidasa observada en la cepa silvestre con la detectada en los mutantes *crc* (KTVC), *hfq* (KT2440 Δ *hfq*) y *hfq crc* (KTHC) en medio MMlowFe y fase exponencial (0,7 A_{600}). Los datos muestran la media \pm SD de tres réplicas independientes.

5.3.7. La inactivación de *hfq* provoca un cambio morfológico en fase estacionaria tardía, pero sólo en medio rico LB

Trabajos previos describieron que la inactivación de *hfq* en *P. putida* afecta a la fisiología de las células de diversas formas, incluyendo la filamentación del mutante *hfq* en fase estacionaria (Arce-Rodríguez et al., 2015). Nosotros hemos observado que dicho efecto se produce en medio LB pero no en medio MMSc (Fig. 36).

Mediante RT-qPCR se comparó la expresión en *P. putida* KT2440 y KT2440 Δ *hfq* de los principales genes responsables de la división celular (*ftsZ*, *ftsA*, *mreB*, *bolA* y *zipA*), usando para ello células crecidas en medio LB hasta fase estacionaria (2,5 A₆₀₀). No se observaron diferencias significativas en ninguno de ellos (datos no mostrados), por lo que si Hfq estuviera regulando estos genes seguramente sería de manera post-transcripcional y sin afectar a la abundancia de los transcritos analizados. Así pues, parece que en medio rico, al llegar a fase estacionaria, Hfq regula la división celular de forma independiente de Crc, probablemente mediando la interacción de algún ARNp dependiente de la fase de crecimiento y del medio, con algún ARNm diana, aunque actualmente desconocemos los elementos implicados.

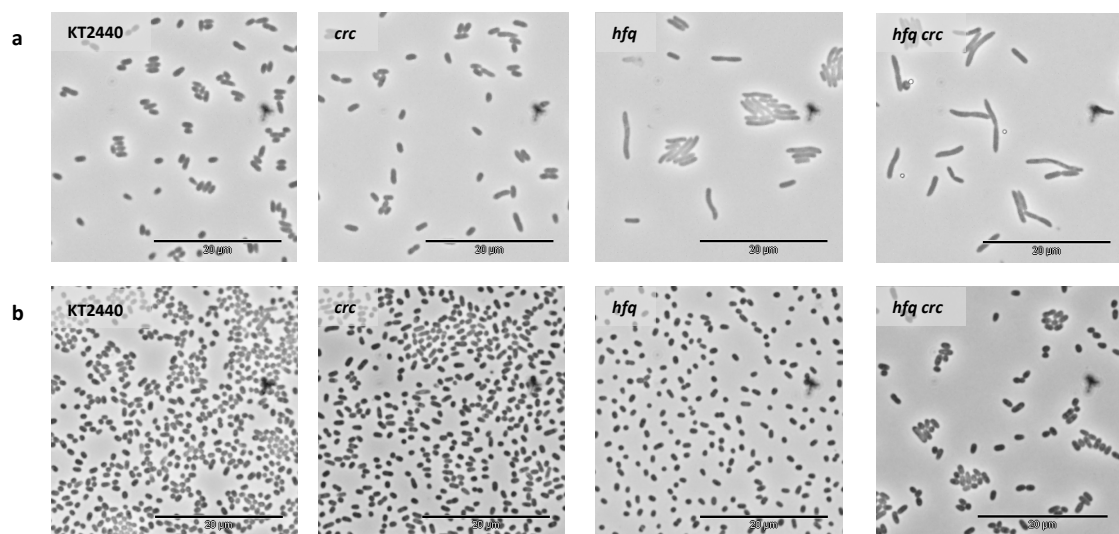


Figura 36 | Morfología de las células *P. putida* KT2440, *crc* (KTVC), *hfq* (KT2440 Δ *hfq*) y *hfq crc* (KTHC) tras (a) 24 h de crecimiento en medio LB y (b) 36 h en medio MMSc. Se aprecia que en LB la falta de Hfq ocasiona una filamentación de la célula que no tiene lugar en MMSc. Se indica la escala de 20 µm.

5.3.8. Efecto aditivo de la inactivación de *hfq* y *crc*: Motilidad tipo *swimming*

Según el actual modelo de RC, una vez que la proteína Hfq reconoce a los ARNm diana hace falta que se incorpore Crc para que el complejo formado sea estable. Así pues, el efecto que provoca la ausencia de Hfq debería ser muy semejante al impacto ocasionado por la ausencia conjunta de Hfq y Crc. Sin embargo, en el ensayo de transcriptómica puede verse que la falta conjunta de Hfq y Crc tiene un efecto aditivo, ya que el número de genes cuya expresión se ve alterada en el mutante doble KTHC (301 genes) es mayor que en los mutantes KT2440 Δ *hfq* (179 genes) y KTVC (82 genes). Así mismo, la intensidad del cambio de expresión tiende a ser más acusada en el mutante doble, tal y como se aprecia en los 28 genes cuya expresión está alterada en los tres mutantes (Tablas S1, S2 y S3), presentando un cambio medio de $\pm 4,3$ veces en KTVC, $\pm 7,3$ veces en KT2440 Δ *hfq* y ± 10 veces en KTHC. Esta tendencia hacia un efecto más pronunciado en KTHC ha sido observada también mediante RT-qPCR de varios genes y mediante fusiones a *lacZ* de algunos promotores (Tabla 6 y datos no mostrados).

Al examinar qué genes estaban afectados en el mutante doble KTHC pero no en los mutantes sencillos KTVC y KT2440 Δ *hfq* nos llamó la atención la menor expresión de algunos genes relacionados con la motilidad, como *flgA* o *aer-1*. La información previa de la que disponíamos indicaba que la inactivación de *hfq* en *P. putida* reduce, pero no imposibilita, la motilidad tipo *swimming* (Arce-Rodríguez et al., 2015). Sin embargo, en el caso de *P. aeruginosa*, se ha descrito que la ausencia de Hfq reduce la motilidad tipo *swarming* y la motilidad tipo *twitching*, pero no así la motilidad tipo *swimming* (Sonnleitner et al., 2003). Los datos que aquí presentamos sugieren que la ausencia Hfq en *P. putida* afecta a la motilidad tipo *swimming* cuando utiliza algunas fuentes de carbono, y el efecto es más acusado si faltan tanto Hfq como Crc (Fig. 37).

Se comparó la motilidad tipo *swimming* en las estirpes KT2440, KTVC, KT2440 Δ *hfq* y KTHC creciendo en medio mínimo con diversas fuentes de carbono, y se observó que aunque la motilidad *swimming* de KTVC y de KT2440 Δ *hfq* es bastante similar a la de la estirpe parental cuando las células utilizan succinato o fumarato como fuente de carbono, ésta se reduce en el mutante *hfq* cuando utiliza citrato, glucosa o sacarosa. Por su parte, el mutante doble KTHC es siempre incapaz de moverse mediante *swimming*, independientemente de la fuente de carbono utilizada (Fig. 37g).

Se ha descrito que la inactivación de los genes *fpvA* y *pvdD* en *P. putida*, ambos implicados en la homeostasis del hierro, afecta negativamente la motilidad tipo *swarming*, y que la motilidad se recupera cuando son expuestos a 18,2 μ M de FeCl₃ (Matilla et al., 2007). Dado que en los mutantes *crc* (KTVC), *hfq* (KT2440 Δ *hfq*) y *hfq crc* (KTHC) hay menor expresión de dichos genes, y que tanto en la motilidad tipo *swarming* como tipo *swimming* está implicado el flagelo, analizamos la posibilidad de que el hierro estuviera implicado en el descenso de motilidad tipo *swimming* repitiendo el ensayo en medio MMLowFe (0,3 μ M de hierro) sin suplementar y suplementado con 10 μ M o 100 μ M de FeCl₃. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los medios (datos no mostrados), indicando que los mecanismos

subyacentes que afectan a la motilidad tipo *swimming* en KTHC y a la motilidad *swarming* en los mutantes *fpvA* y *pvdD* no están relacionados.

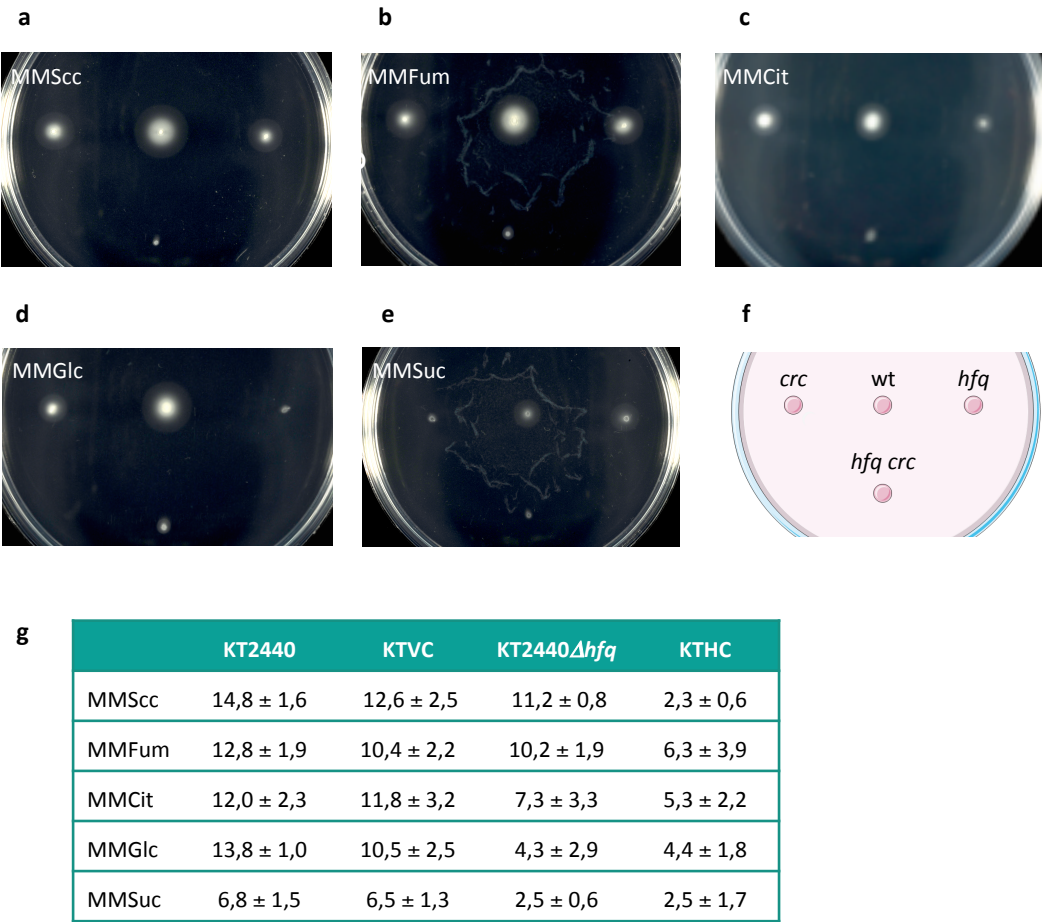


Figura 37 | Comparación de la motilidad tipo *swimming* en *P. putida* KT2440 y los mutantes *crc* (KTVC), *hfq* (KT2440Δ*hfq*) y *hfq crc* (KTHC), creciendo en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono: **(a)** succinato, **(b)** fumarato, **(c)** citrato, **(d)** glucosa y **(e)** sacarosa. **(f)** Esquema de la disposición de las estirpes en las placas. **(g)** Se realizó el experimento dos veces, con duplicados técnicos. Estos datos corresponden al radio (en mm) de la dispersión desde el punto de inóculo inicial, indicándose la media ± SD obtenidas para cada estirpe y condición.

6. DISCUSIÓN

Capítulo 1 | Papel del activador transcripcional CbrB en la regulación de CrcZ y CrcY.

Síntesis y procesamiento del transcrito CrcZ*

Aunque hace años se consideraba a los ARNs como simples moléculas mensajeras entre el ADN y las proteínas, cada año se describen nuevos ARN pequeños (ARNp) no codificantes, implicados en el control de la expresión génica y responsables de respuestas rápidas a cambios ambientales o fisiológicos. Los ARNp permiten a la bacteria una modulación fina de su metabolismo y la hacen más adaptable y competitiva (Storz et al., 2011). Como ya hemos comentado en esta tesis doctoral, el número de ARNp descritos está en constante aumento: hasta la fecha en el género *Pseudomonas* se han descrito más de 400 posibles ARNp, tanto en *P. aeruginosa* como en *P. putida* (Gómez-Lozano et al., 2015; Bojanovic et al., 2017), de los cuales sólo unos pocos han sido caracterizados funcionalmente. Uno de los más estudiados, CrcZ, regula la asimilación jerárquica de las fuentes de carbono (represión catabólica, RC) y está presente en todas las bacterias del género *Pseudomonas* analizadas, algunas de las cuales poseen además ortólogos similares a CrcZ en secuencia y función, como CrcY en *P. putida* (Moreno et al., 2012) y CrcX en *P. syringae* (Filitrault et al., 2013).

❖ Síntesis y procesamiento del transcrito CrcZ*: Los ARNp CrcZ y CrcY comparten función reguladora, llegando al punto de que cuando la producción de uno de ellos está afectada (como en los mutantes *crcZ* y *crcY*), se ve incrementada la abundancia del otro, generando un efecto compensatorio (Moreno et al., 2012). Se ha observado que, de forma adicional, la bacteria posee una delicada regulación que asegura niveles fisiológicos basales de CrcZ y CrcY a fin de evitar un efecto represor excesivo por parte de Crc y Hfq, el cual resulta muy perjudicial, tal y como se deduce del fenotipo del mutante doble *crcZ crcY* (estirpe KT2440-ZY), que carece por completo de estos ARNp, tanto de sus formas primarias como procesadas (Moreno et al., 2012; García-Mauriño et al., 2013; Hernández-Arranz et al., 2016; este trabajo).

Estos niveles basales de CrcZ y CrcY se conseguirían mediante la síntesis de un transcrito largo que, en el caso de *crcZ*, se origina en *PcbrB*, un promotor menos activo que *PcrcZ* pero cuya actividad es constante. Este transcrito largo es rápidamente procesado en un punto situado entre las posiciones -9 a -5 respecto al +1 de transcripción de *PcrcZ*, produciéndose la digestión del fragmento 5' que contiene a *cbrB*, pero no así la digestión del extremo 3' correspondiente a *crcZ*, generando y acumulando un transcrito CrcZ procesado (CrcZ*) de tamaño casi idéntico a CrcZ (Fig. 38). En la estirpe silvestre el transcrito CrcZ* supone un porcentaje pequeño del total (< 20%), pero en el mutante $\Delta rpoN$ CrcZ* es la única forma de CrcZ presente en la bacteria (porque recordemos, el promotor *PcrcZ* es dependiente de RpoN). Curiosamente, en la estirpe $\Delta rpoN$ la actividad de *PcbrB* se ve incrementada unas 3 veces, favoreciendo la producción de CrcZ*, lo que ayuda a explicar por qué este mutante tiene unos niveles de transcrito de *crcZ* similares a los de la estirpe silvestre. Sin embargo, las razones de este incremento no se conocen a día de hoy.

Así pues, en el transcrito *cbrB-crcZ*, el gen *crcZ* podría ser considerado como una región 3' UTR del gen *cbrB*, capaz de generar un ARNp por procesamiento; pues a pesar de que el

extremo 5' es diferente, ambas formas comparten el terminador transcripcional del extremo 3'. Actualmente no sabemos qué endonucleasa es responsable de este procesamiento o cuáles son las señales específicas que reconoce, pero creemos que el reconocimiento se produce en un lugar posterior al sitio de corte. Esta hipótesis deriva de una fusión realizada en el laboratorio para sobre-expresar CrcZ (plásmido p424-Z, Moreno et al., 2012) de la cual se genera un transcrito de *crcZ* con 62 nt extra en el extremo 5', correspondientes al sitio de clonaje del vector. Tras ser expresado *in vivo* en *P. putida*, ese transcrito de *crcZ* es nuevamente procesado generando un ARN de tamaño muy similar al transcrito CrcZ primario (Hernández-Arranz et al., 2016). Este hecho sugiere que el procesamiento de CrcZ depende de una secuencia o estructura localizada después del lugar de corte. Una observación similar ha sido descrita recientemente para el ARNp GlmZ de *E. coli*, el cual posee una estructura central de tallo-lazo (en inglés *stem-loop*) decisivo para su procesamiento por la RNasa E, mientras que la secuencia concreta del sitio de corte no influye (Göpel et al., 2016).

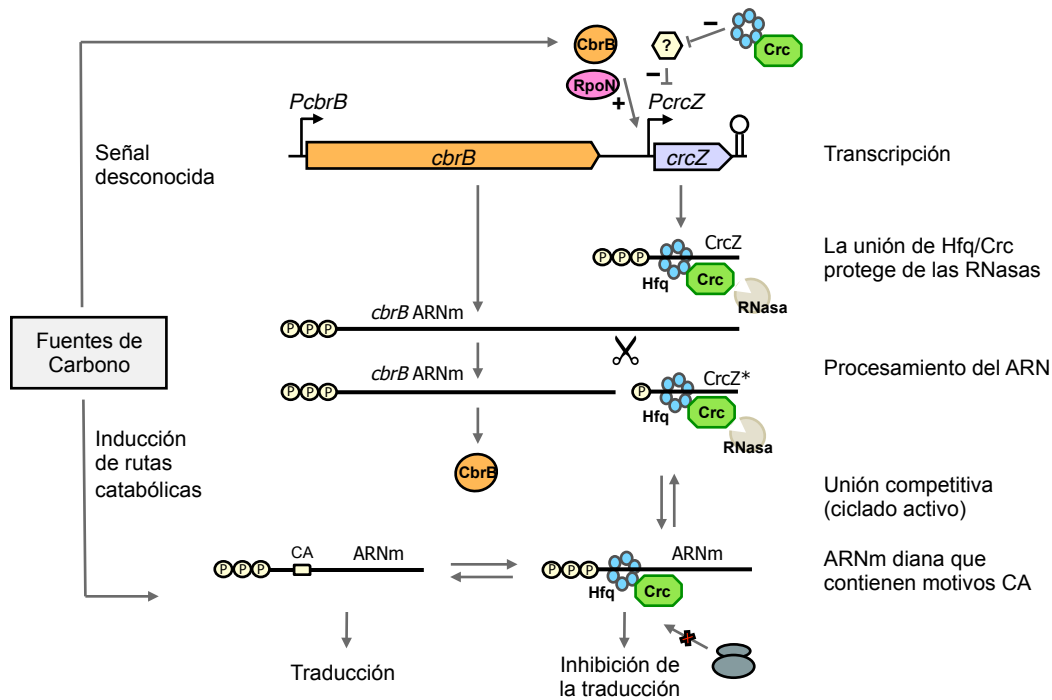


Figura 38 | Modelo de la regulación de Hfq/Crc/CrcZ. Ver detalles en el texto. Imagen adaptada de Hernández-Arranz et al., 2015.

El ARNp CrcY de *P. putida*, funcionalmente redundante a CrcZ, se localiza detrás del gen *mvaB*, que codifica la enzima hidroximetilglutaril-CoA liasa. Al igual que ocurre en CrcZ, además de transcribirse desde su promotor *PcrcY* (dependiente de CbrB y RpoN), *crcY* también se transcribe en forma de un transcrito largo, originado por encima de *mvaB* que, tras ser procesado, genera CrcY*, que en la estirpe silvestre supone el 40 % del transcrito CrcY total (García-Mauriño et al., 2013). Por ende, CrcY también podría ser considerado una 3'UTR de *mvaB*, o más bien, del gen PP3539, ya que *mvaB* no tiene promotor propio y se cotranscribe con PP3539 (López-Sánchez et al., 2013). Esto también parece suceder en *P. syringae*, donde

se ha visto que CrcZ y CrcX pueden proceder de dos promotores diferentes, uno reconocido por RpoN y otro reconocido por otro factor sigma (Filitrault et al., 2013).

Posteriormente otros miembros del laboratorio han comprobado que CrcZ* es funcionalmente equivalente a CrcZ, esto es, que es capaz de secuestrar Crc y Hfq y atenuar así la represión catabólica. La hipótesis actual propone que la función de los ARN procesados CrcZ* y CrcY* es mantener unos niveles basales mínimos constantes en la célula que no dependan de factores externos y que eviten el perjudicial fenotipo hiper-represor producido en ausencia total de los ARNp CrcZ y CrcY (Hernández-Arranz et al., 2016). Por otro lado, tal y como se sugería en la introducción, es improbable que CrcZ y CrcY (o sus formas procesadas CrcZ* y CrcY*) secuestren la totalidad de Hfq en la célula. Actualmente se propone un modelo según el cual, tras la unión inicial de Hfq y los ARNp CrcZ y CrcY, Crc se incorporaría al complejo, quedando pues comprometida la regulación de la represión catabólica al no estar Crc disponible. Incluso si toda la proteína Crc está unida a CrcZ+CrcY, pensamos que aún queda bastante Hfq disponible para otras funciones de riboregulación.

Quisimos estudiar la producción de CrcZ* y CrcY* en un contexto génico sin CbrB (el activador transcripcional de *PcrcZ* y *PcrcY*), lo cual nos indicaría cuáles son los niveles basales de estos transcritos en diferentes condiciones, en un fondo genético diferente al del mutante *ΔrpoN*, que tiene alterada la expresión de un gran número de genes (Köhler et al., 1989; Cases et al., 2003). Con este fin construimos los mutantes traduccionales de *cbrB*, KTB1 y KTB340. No obstante, los datos descritos en esta tesis doctoral sugieren que *cbrB* y *crcZ* forman una unidad transcripcional, y que no puede alterarse *cbrB* sin afectar a la transcripción de *crcZ*. En consecuencia, los mutantes traduccionales KTB1 y KTB340 carecen por completo de CrcZ, no sólo porque el promotor *PcrcZ* esté inactivo por falta de CbrB, sino porque también está comprometido el transcrito largo originado desde *PcbrB*, aunque, curiosamente, el motivo parece ser diferente en cada uno de los dos mutantes. En el caso de KTB1 está afectada la transcripción de *PcbrB*, pues la fusión *PcbrB*1-lacZ* no es activa, lo que automáticamente explica la falta de CrcZ*. Sin embargo, la fusión *PcbrB*340-lacZ* sí es activa, lo que implica que el promotor *PcbrB* en KTB340 es activo, sugiriendo que la falta de CrcZ* se debe a motivos post-transcripcionales desconocidos. Quizás se trate de una desregulación del procesamiento del transcrito largo o de una menor estabilidad del transcrito no traducido respecto al sí traducido (Kaberdin and Bläsi, 2006).

El hecho de que *cbrB* y *crcZ*, funcionalmente relacionados, formen una única unidad transcripcional en *P. putida*, y que su posición adyacente esté conservada en todas las especies secuenciadas del género *Pseudomonas*, sugiere que su transcripción, y probablemente el procesamiento que da lugar a CrcZ*, puede suceder en otras especies de *Pseudomonas*.

Hemos visto que la pérdida de CbrB conduce a una disminución de la eficacia biológica (*fitness*) cuando la bacteria se cultiva en medio mínimo con succinato, citrato o tirosina como única fuente de carbono, pero no así en medio LB; coincidiendo con las observaciones previas de Amador et al. (2016). No obstante, nuestros datos muestran ciertas diferencias entre el *fitness* de KTB1 y el de KTB340. Si bien KTB1 se comporta de forma similar al mutante KT2440-ZY (mutante doble *crcZ crcY*) en todos los medios ensayados, el mutante KTB340 presenta un

fitness intermedio entre KT2440-ZY y la estirpe silvestre KT2440. Esto sugiere que la proteína truncada CbrB*340, que incluye el dominio receptor (dominio REC), podría ser suficiente para que la transducción de señal tenga lugar, proceso que se ha visto es necesario para que CbrA actúe como transportador en aquellas condiciones en las que es susceptible de hacerlo (Zhang et al., 2015). Otra posibilidad es que la proteína truncada CbrB*340 sea parcialmente activa, e interactúe de forma limitada como activador de transcripción a pesar de carecer del final del dominio ATPasa y del dominio de unión a ADN (dominio HTH). Existen casos descritos de activadores transcripcionales de promotores dependientes de RpoN que pueden activar la transcripción desde promotores que carecen de sitios de unión del activador, o incluso que son activos sin unirse al ADN (Huala and Ausubel 1989; Huala et al., 1992; Berger et al. 1994; Porrúa et al., 2009). Sin embargo, si éste fuera el caso de CbrB*340, esta propiedad no sería suficiente para actuar como activador transcripcional de *PcrcZ* y *PcrcY*, pues recordemos que KTB340 carece de *CrcZ* y *CrcY*.

En la bibliografía hay descritos dos mutantes *cbrB* de *P. putida* con diferente fenotipo: MPO406, con el gen *cbrB* interrumpido con el minitransposón *miniTn5-luxAB-Km* (Amador et al., 2010), y MPO401, usado como control en esta tesis doctoral, y que tiene el gen *cbrB* interrumpido por el minitransposón *miniTn5-Km* (García-Mauriño et al., 2013). Aunque MPO401 carece por completo de transcritos *CrcZ*, al igual que nuestros mutantes KTB1 y KTB340, se sabe que el mutante MPO406 tiene niveles bastante altos de *CrcZ**, probablemente debido a la actividad del promotor del gen de resistencia de kanamicina, cuya transcripción continuaría hasta *crcZ*. Curiosamente, MPO406 y MPO401 no sólo difieren en la abundancia de *CrcZ*, sino que se ha visto que MPO406 produce más *biofilm* que la estirpe silvestre y, además, impide su dispersión (Amador et al., 2016). Estas diferencias podrían ser debidas a la presencia en MPO406 de una forma truncada de CbrB de 223 aminoácidos, que incluye el dominio REC (Amador et al., 2010). Estos resultados, unidos a las diferencias observadas en KTB1 y KTB340 en esta tesis doctoral, apuntan a que el dominio REC de CbrB podría ser suficiente para determinadas funciones del sistema CbrA/CbrB, aunque los datos de los que disponemos por el momento no permiten definir en qué procesos podría estar actuando la proteína truncada de CbrB, o cómo lo haría.

El hecho de que el doble mutante *cbrB crc* (estirpe KTB1CRC), obtenido de forma espontánea durante la construcción de los mutantes KTB1 y KTB340, presente una velocidad de crecimiento similar a la estirpe silvestre en todas las condiciones testadas, sugiere que la pérdida de *CrcZ* y *CrcY* en los mutantes traduccionales de *cbrB* genera un fenotipo hiper-represor que, en KTB1CRC, es corregido por la falta de *Crc*. La aparición de este mutante supresor también nos sirve para definir una región importante para la actividad de *Crc*, una región de aminoácidos básicos $_{135}\text{KQRRKRR}_{141}$, localizada entre la 6ª hélice α y la 8ª lámina β de *Crc*, la cual había sido previamente sugerida como región de potencial interés para la funcionalidad de *Crc* (Sahu, 2009, Tesis Doctoral).

❖ Análisis de la actividad del promotor *PcbrB*: Actualmente no están claras las razones o mecanismos que hay tras las variaciones de actividad que experimenta el promotor *PcbrB*, no sólo por el incremento de actividad observado en ausencia de RpoN, sino también

por la existencia de una zona 3' que aumenta bastante su actividad. Recordemos que la fusión *PcbrBfw1rv8-lacZ*, que contiene el promotor *PcbrB* hasta 20 bases antes del punto de inicio de la traducción, pero nada de la zona codificante del gen *cbrB*, tiene una actividad bastante baja, que aumenta 12,5 veces al incluir, al menos, los primeros 220 – 290 nt del gen *cbrB*. Al medir la cantidad de transcrito, y compararla con la actividad β -galactosidasa de estas fusiones, pudimos comprobar que este efecto es, efectivamente, transcripcional.

En este sentido también resulta muy curioso el diferente comportamiento de las fusiones *PcbrB*1-lacZ* y *PcbrB*340-lacZ*. La falta de actividad β -galactosidasa de *PcbrB*1-lacZ* ratifica que no es posible modificar la zona próxima al promotor *PcbrB* sin alterar su actividad, a pesar de mantener íntegra la región de 220 – 290 nt detectada como necesaria. Por otro lado estos datos sugieren que, conservar la actividad del promotor *PcbrB*, tal y como ocurre en *PcbrB*340-lacZ*, no es suficiente para mantener una correcta actividad de la unidad transcripcional *cbrB-crcZ* y por tanto una correcta producción de CrcZ*.

Llama la atención que esta región de *cbrB* que aumenta la actividad del promotor presente varias secuencias muy ricas en C+G, las cuales podrían servir como una diana de unión de alguna proteína reguladora. Se sabe que en algunos promotores la ARN polimerasa forma complejos relativamente estables que tienen dificultades para avanzar hasta la etapa siguiente, en la que la ARN polimerasa escapa del promotor y forma un complejo de transcripción estable (Hatoum and Roberts, 2008). En estos casos, la ARN polimerasa queda atrapada en estadios intermedios del proceso de escape, lo cual reduce mucho la actividad del promotor. De forma análoga, se ha observado que las zonas localizadas inmediatamente después del punto de inicio de la transcripción pueden facilitar, o no, el proceso de escape de la ARN polimerasa del promotor (Knaus and Bujard, 1988). Por lo tanto, es posible que el promotor *PcbrB* sea uno de estos casos en los que la ARN polimerasa tiene dificultades para abandonar el promotor, y que las zonas localizadas inmediatamente detrás del punto de inicio de la transcripción faciliten el escape y la formación de un complejo de transcripción activo. Quizá las secuencias ricas en C+G faciliten este proceso de escape, bien modificando la estructura del ADN o bien sirviendo de sitio de unión para alguna proteína reguladora que desconocemos. En cualquier caso, no hemos analizado este aspecto con el detalle suficiente como para poder proponer una explicación concluyente.

CAPÍTULO 2 | Análisis de la formación de complejos nucleoproteicos de Crc, Hfq y ARN mediante microcalorimetría

Cuando analizamos mediante ITC la constante de disociación del ARN *alkS* y Hfq en ausencia y en presencia de Crc no vimos diferencias entre ambos valores (la $K_d=45 \pm 11,3$ nM y la $K_d= 39 \pm 24$ nM, respectivamente). Los valores de constante de disociación (K_d) aquí determinados encajan con los valores de afinidad previamente calculados mediante termoforesis en microescala (MST, del inglés *microscale thermophoresis*), según los cuales la proteína Hfq de *P. aeruginosa* se une al ARN *amiE* con una K_d de $43,2 \pm 2,3$ nM, a *antR* con una K_d de 37,3 nM y a CrcZ con mucha mayor afinidad, K_d de 7,4 nM (Sonnleitner et al., 2017a;

Sonnleitner et al., 2017b). Sin embargo, en estos experimentos sí se observó un incremento de la afinidad de Hfq por el ARN *amiE* cuando Crc está presente, reduciéndose de K_d $43.2 \pm 2,3$ nM sin Crc a $33,9 \pm 1,7$ nM en su presencia. El hecho de que nosotros no veamos diferencias seguramente tenga que ver con grandes diferencias obtenidas en los duplicados que conllevan una desviación estándar muy grande, que sugieren que ésta no es la técnica más adecuada para analizar la formación de los complejos Hfq/ARN/Crc.

CAPÍTULO 3 | Efecto de la inactivación de los genes *hfq* y *crc* en células creciendo en medio mínimo con succinato

❖ Descripción de la estirpe KT2440-FR: En esta tesis hemos detectado que la estirpe de *P. putida* KT2440 utilizada durante años en nuestro laboratorio, y a la que hemos denominado KT2440-FR, tiene una delección en el genoma que afecta a la región comprendida entre los genes PP2225 y PP2259, aproximadamente. Al comparar las estirpes KT2440, procedente del laboratorio de Víctor de Lorenzo, y KT2440-FR, se observa que KT2440-FR tiene una velocidad de crecimiento menor en algunos medios, así como menor motilidad natatoria (motilidad tipo *swimming*). Aunque desconocemos el motivo responsable de esta alteración en la motilidad, creemos que podría estar relacionado con la falta de *pctB* (PP2259), un gen descrito como un transductor de señal de quimiotaxis de aminoácidos (Taguchi et al., 1997), viéndose acrecentado este efecto en MMScc debido a la pérdida del transportador de dicarboxilatos *dctA-III* (PP2255).

Esta delección debió tener lugar en momentos muy iniciales de la línea de trabajo de nuestro laboratorio, puesto que todos los aislados congelados de KT2440 de los que disponemos de los años 1988 en adelante muestran dicha delección, mientras que la cepa conservada en el laboratorio de Víctor de Lorenzo no lo hace. La presencia de esta delección no resta validez a los experimentos realizados hasta la fecha, dado que al haber trabajado siempre con cepas isogénicas la delección de KT2440-FR ha estado presente en todas las estirpes analizadas que derivan de ella.

❖ Función de Crc en medio MMScc: Tanto el ensayo de transcriptómica como el de proteómica indican que, en medio mínimo con succinato (MMScc) como única fuente de carbono, la influencia de la proteína Crc es mucho menor que la observada anteriormente en medio rico LB (Moreno et al., 2009a). La baja influencia de Crc en MMScc va en consonancia con el alto nivel de expresión de los ARNp CrcZ y CrcY en este medio, 7 veces mayor que cuando las células crecen en LB (La Rosa et al., 2015), y con el hecho de que muchos de los genes que en LB están regulados por Hfq y Crc no son susceptibles de dicha regulación en MMScc pues, al carecer del correspondiente inductor, no se estarían expresando. Como consecuencia, aunque en *P. aeruginosa* la ausencia de Crc regula genes como *acsA*, *aroP2*, *estA* o *bkdA1* tanto en medio LB como en medio mínimo con succinato como fuente de carbono (Sonnleitner et al., 2012), nosotros no hemos detectado cambios de expresión en ninguno de

dichos genes, debido a que el medio mínimo con succinato ejerce una alta represión catabólica en *P. aeruginosa* (Sonnleitner et al., 2009), pero no en *P. putida*.

Al observar los resultados del ensayo de transcriptómica parece intuirse la existencia de genes regulados por Crc de forma independiente a Hfq (genes solamente afectados en KTVC, o genes afectados en KTVC y KTHC pero no en KT2440Δ*hfq*), lo que en principio no se ajusta por completo a la idea de que Crc requiera estrictamente de la presencia de Hfq para unirse a los ARNm. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la inactivación de *crc* no sólo ocasiona la pérdida de la proteína Crc y la consecuente desregulación de la RC, sino también una alteración del sistema de regulación de CrcZ y CrcY que antagonizan la función de Hfq y Crc. Se sabe que, en ausencia de Crc, la producción de CrcZ y CrcY está muy disminuida (Hernández-Arranz et al., 2016). Además, los complejos que pudiesen formarse entre Hfq y estos ARNp no serían estables en ausencia de Crc. Por lo tanto, en MMScc, condición donde la producción de CrcZ y CrcY en la cepa silvestre es alta, habría más proteína Hfq disponible que en la cepa silvestre ejerciendo funciones independientes de Crc, tales como facilitar la interacción de pequeños ARNs con sus ARNm diana, una regulación que no tendría lugar en la estirpe silvestre, en la que sí hay Crc y el complejo Hfq/Crc/CrcZ-Y es estable.

Otra posible explicación para los genes afectados en el mutante *crc* pero no en el mutante *hfq* sería la existencia de una hipotética tercera proteína involucrada, capaz de colaborar con Crc en la regulación de los ARNm cuando Hfq no está disponible. Aunque actualmente no hay evidencias de que exista otra proteína implicada, si la hubiera esto ayudaría a explicar por qué el número de genes cuya expresión cambia es mayor en el mutante doble *hfq crc* (KTHC, 301 genes) que en el mutante *hfq* (KT2440Δ*hfq*, 179 genes), en vez de ser semejante, como debería ocurrir si Crc requiere forzosamente de Hfq para unirse a los ARNm diana. En este sentido se ha descrito recientemente toda una familia nueva de chaperonas de ARN representadas en casi todas las bacterias, funcionalmente similares a Hfq pero muy distintas en estructura y secuencia llamadas ProQ (Sheidy and Zeilke, 2013; Smirnov et al., 2017).

Recientemente Sonnleitner et al. (2017b) han realizado una comparación del efecto de la inactivación de los genes *crc* o *hfq* en el transcriptoma de *P. aeruginosa* crecida en medio mínimo, y describen que la falta de Crc afecta a 149 genes y la falta de Hfq a 332 genes, 105 de los cuales están afectados en ambos mutantes. Estos números son mayores que los detectados en nuestro ensayo porque el medio empleado para crecer los cultivos, además de contener succinato (la única fuente de carbono presente en nuestro medio MMScc), contiene fuentes de carbono adicionales tales como acetato, glucosa, manitol, acetamida, histidina, triptófano, fenilalanina, leucina, isoleucina, arginina, valina, antranilato y glicerol. Se sabe que muchos de los genes regulados por Crc y Hfq requieren de la presencia del inductor para transcribirse, el cual estaría presente en un medio complejo pero no en nuestro medio mínimo MMScc, lo que explica las diferencias entre ambos trabajos.

❖ Función de Hfq en medio MMScC: Al analizar en detalle qué genes están afectados en el mutante *KT2440Δhfq* se observa que muchos de ellos corresponden a proteínas de unión y transporte de sustratos o son genes relacionados con el metabolismo energético de la célula, entre los que se incluyen genes de la cadena de transporte de electrones. Los niveles de los ARNs correspondientes a las oxidasas terminales Cbb3-1 y Aa3 son menores en el mutante *hfq* que en la cepa silvestre, lo que puede estar relacionado con un ajuste en la composición de la cadena de transporte de electrones en función de la demanda energética de dicho mutante. También se observa cambio de expresión de algunos genes que codifican porinas u otras proteínas de la envuelta celular, hecho que puede estar relacionado con el aumento de susceptibilidad a los antibióticos detectado en el mutante *hfq* (Arce-Rodríguez et al., 2015). Sin embargo, entre las categorías funcionales con un mayor número de genes afectados en el mutante *KT2440Δhfq* destacan los genes sin función asignada, los genes de elementos génicos móviles (principalmente profagos), y los genes relacionados con la homeostasis del hierro.

Hemos observado que, en algún punto previo al ensayo de transcriptómica descrito en esta tesis, el profago 1 se escindió de la estirpe *KT2440Δhfq*, cepa en la que se observa un aumento de la expresión de los genes que componen el profago 4 y un tenue incremento de la expresión de los genes incluidos del profago 3. El aumento de expresión de estos profagos desencadenado por la inactivación de *hfq*, unido a la escisión y pérdida del profago 1, apunta a la participación de la proteína Hfq en la regulación de los ciclos lítico y lisogénico de los profagos, ya sea directamente o bien como consecuencia de las mayores tasas de estrés que presenta este mutante (Martínez-García et al., 2015a). No obstante, estas observaciones por sí mismas no son suficientes para definir el papel de Hfq en el proceso, sirviendo simplemente como nota de interés.

La mayor parte de los esfuerzos derivados del ensayo de transcriptómica sirvieron para establecer qué papel tiene Hfq en la homeostasis del hierro en *P. putida*. Se sabe que, en *E. coli*, la falta de Hfq conlleva un descenso de la vida media del transcrito de *fur*, y por ende, un aumento de la abundancia de aquellos genes que regula, como *ryhB* o *sodB* (Vecerek et al., 2003). Sin embargo, en nuestras condiciones de estudio la ausencia de Hfq en *P. putida* *KT2440* no modifica la abundancia de transcrito *fur* o de proteína Fur, evidenciando que la regulación no es idéntica en ambos microorganismos.

De los 179 genes cuya expresión está afectada en el mutante *hfq*, 39 están relacionados con la homeostasis del hierro. Entre los genes afectados se incluyen los genes de producción del sideróforo pioverdina (PVD), cuya expresión es menor en ausencia de Hfq y de Crc. Por el contrario, diversos genes que codifican receptores de sideróforos, factores sigma extracelulares (ECF- σ) y el complejo TonB, tienen una expresión mayor en el mutante *hfq* (y/o en el *hfq crc*) que en la estirpe silvestre. La expresión de los genes que codifican los factores ECF- σ y anti- σ está inhibida transcripcionalmente por el regulador Fur cuando la cantidad de hierro intracelular es alta. Además, los factores anti- σ secuestran e inhiben la actividad de los factores ECF- σ , pero en respuesta a determinada transducción de señales su conformación cambia, quedando los factores ECF- σ disponibles para ejercer su función. En estas condiciones, estos ECF- σ colaboran junto con la ARN polimerasa en la transcripción de genes implicados en

la captación de hierro, entre ellos los correspondientes a algunos de los receptores de sideróforos dependientes de TonB. De igual manera Fur inhibe transcripcionalmente a los ARNp PrrF1 y PrrF2, encargados de regular post-transcripcionalmente genes de proteínas de acumulación de hierro (como bacterioferritinas), o genes que codifican enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que necesitan hierro como cofactor (por ejemplo la aconitasa, la succinato deshidrogenasa y la fumarato deshidrogenasa), entre otros.

Hemos comprobado que la inactivación de *hfq* conlleva un descenso de la producción del sideróforo pioverdina en condiciones de baja disponibilidad de hierro, tanto en medio líquido (MMlowFe) como en medio sólido (MMScC con 1,2 mM del quelante de hierro 2,2-BP); y que al complementar el mutante KT2440 Δ *hfq* en *trans* con el gen *hfq*, mediante el plásmido pHFQ, éste recupera una producción de PVD equivalente a la de la estirpe silvestre. Aunque en el ensayo de RNA-Seq se observa un descenso en la expresión de genes de biosíntesis de PVD tanto en el mutante *hfq* (KT2440 Δ *hfq*) como en el mutante *crc* (KTVC), nosotros no hemos observado efecto de *Crc* en la producción de PVD. En este punto conviene recordar que los datos del RNA-Seq corresponden a una condición de alta disponibilidad de hierro (MMScC, 84,5 μ M de Fe) para la que no se aprecian grandes diferencias en la cantidad de PVD producida, cantidad que en cualquier caso es baja, ya que en MMScC la bacteria contiene altas cantidades de hierro intracelular. También resulta interesante que el efecto de la falta de *Crc* en la producción de PVD en *P. putida* difiere con el observado en *P. aeruginosa*, donde se ha descrito que en ausencia de *Crc*, y en medio LB, aumenta la cantidad de PVD producida (Corona, 2017, Tesis Doctoral). Esto evidencia una vez más que si bien estas dos especies bacterianas son filogénicamente muy cercanas, difieren en algunos aspectos clave de la regulación de sus genes y, por ende, se debe ser cauto en la generalización de los resultados obtenidos del estudio de cada una de ellas.

Actualmente no conocemos el mecanismo preciso por el cual la ausencia de Hfq desencadena la reducción en los niveles de pioverdina, y probablemente se deba a una combinación de varios factores. Parte del efecto podría estar relacionado el regulador global IscR. En muchas bacterias, entre las que se incluye *E. coli* y las bacterias del género *Pseudomonas*, los genes *isc* participan en la maduración de los grupos hierro-azufre ([Fe-S]), componentes de los centros catalíticos de muchas proteínas. Se estima que en *E. coli* hay cerca de 80 proteínas con grupos [Fe-S], muchas de las cuales están relacionadas con procesos respiratorios (citocromo c oxidasas de la cadena de transporte de electrones, enzimas de la respiración del nitrato, etc.), diferentes rutas de biosíntesis, o forman parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Py and Barras, 2010). En *E. coli*, cuando los niveles de los grupos [Fe-S] son altos, IscR y el ARNp RyhB reprimen la expresión de los genes *isc* (Schwartz et al., 2001; Desnoyers et al., 2009). Además, al sobre-expresar IscR en *P. aeruginosa* mediante un plásmido multicopia, la cantidad total de hierro disponible en la célula aumenta y la producción de PVD disminuye (Romsang et al., 2014). En nuestros datos de transcriptómica se observa un incremento en la expresión de *iscR* (PP0841) de > 5 veces en el mutante doble KTHC, y de 2,96 veces en el mutante KT2440 Δ *hfq* (Fig. 39).

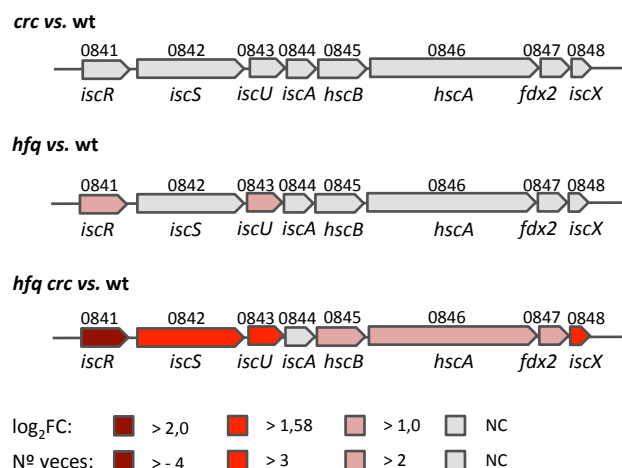


Figura 39 | Representación del cambio de nivel de expresión ($\log_2FC \geq 1$ y $FDR \leq 0,01$) que experimentan los genes *isc* en los mutantes *crc* (KTVC), *hfq* (KT2440 Δ *hfq*) y *hfq crc* (KTHC), respecto a la estirpe silvestre KT2440. En gris los genes sin cambio de expresión y en rojo los genes más expresados en el mutante.

Mediante ICP-MS hemos comprobado que la concentración intracelular de hierro en *P. putida* es directamente dependiente de la disponibilidad de este metal en el medio, siendo mayor cuanto mayor es su concentración en el medio. Además, hemos visto que tanto en medio con alta (MMSc, 84,5 μ M de hierro) como con baja disponibilidad de hierro (MMlowFe, 0,3 μ M de hierro), la inactivación de *crc* y/o *hfq* no altera la concentración intracelular de hierro, detectándose concentraciones de hierro semejantes en KT2440 y en los mutantes KTVC, KT2440 Δ *hfq* y KTHC. El hecho de que los mutantes en *hfq* consigan mantener su nivel de hierro intracelular a pesar de producir menos PVD y de presentar una menor expresión del gen *fpvA* que codifica el receptor del pioverdina, nos hizo plantearnos si la desregulación de la homeostasis del hierro observada en el RNA-Seq sirve, en parte, para compensar las variaciones provocadas por la falta de Hfq. Éste parece ser el caso de los genes *exbB-exbD-tonB*, que codifican el complejo TonB que suministra la energía necesaria para la internalización de la ferripioverdina (PVD-Fe). No sólo la expresión génica de *exbB-exbD-tonB* es mayor en ausencia de Hfq, sino que al estudiar la actividad de la fusión *PexbB'-lacZ* se vio que ésta se ve incrementada en los mutantes en *hfq* (KT2440 Δ *hfq* y KTHC). Sin embargo, a pesar de que tanto *exbB* como *tonB* contienen motivos CA en su extremo 5', la actividad β -galactosidasa de *PexbB'-lacZ* no varía en el mutante *crc*, quizás porque la distancia de los motivos CA de estos genes a sus respectivos inicios de transcripción es demasiado grande. Se puede asumir, por tanto, que efectivamente se produce un incremento en los niveles del complejo TonB en el mutante *hfq*, que facilita una mayor entrada de PVD-Fe en la célula, permitiendo así mantener niveles intracelulares de hierro semejantes a los de la estirpe silvestre, a pesar de producir significativamente menos cantidad de pioverdina. El hecho de que no se detecten diferencias en la actividad de la fusión *PexbB'-lacZ* en el medio MMSc highFe, condición en la que se realizó el ensayo de transcriptómica, probablemente se deba a las diferencias de sensibilidad de cada técnica, que es mayor en el caso del RNA-Seq que en el

caso de la β -galactosidasa, y más cuando se utilizan vectores como el empleado (pSEVA225T), que portan un origen de replicación *oriV*(RK2), de bajo número de copias.

En cuanto al receptor de pioverdina FpvA, llama la atención que la abundancia de su ARNm es menor en ausencia de Hfq, mientras que en el resto de receptores de sideróforos dependientes de TonB la tendencia es a mayor expresión en los mutantes en *hfq* que en la estirpe silvestre. El hecho de que el factor ECF- σ FpVl que regula la expresión de *fpvA* (Cornelis, 2009) sí esté más expresado en ausencia de Hfq, sugiere que quizás hay más elementos implicados. En este sentido, en *P. aeruginosa* se ha descrito que hay dos receptores de PVD, FpvA y FpvB (Ghysels et al., 2004). Dado que la información disponible sobre los receptores de sideróforos de *P. putida* KT2440 se basa en homología de secuencia no podemos confirmar si, al igual que ocurre en *P. aeruginosa*, esta bacteria presenta más de un receptor de pioverdina, aunque dado el fenotipo del mutante KT2440 Δ *hfq* es una posibilidad.

Como sabemos, la regulación de la homeostasis del hierro depende de la proteína reguladora Fur, la cual es activa cuando hay hierro disponible en la célula, condiciones en las que Fur reprime la transcripción de una serie de genes con dianas Fur en sus promotores, entre ellos *prfF1* y *prfF2*. Previamente hemos comentado que la inactivación de *hfq* y/o *crc* no afecta a los niveles de *fur*; sin embargo, mediante el ensayo de Northern Blot se ha comprobado que la abundancia de los ARNp PrrF1 y/o PrrF2 (PrrF1-F2) disminuye alrededor de 3 veces cuando Hfq está ausente, descenso que sólo es detectable en medio MMlowFe (0,3 μ M de hierro), cuando la actividad de los promotores *PprfF1* y *PprfF2* no está reprimida por Fur. De hecho, al comparar la abundancia de PrrF1 y PrrF2 en KT2440 Δ *hfq* y KTHC no se detectan variaciones en medio con alta y con baja concentración de hierro, lo que indica que en estos mutantes los niveles de PrrF1 y PrrF2 siempre son bajos.

Si bien la actividad de los promotores *PprfF1* y *PprfF2* varía en función de la cantidad de hierro presente en el medio, el patrón de expresión difiere para cada promotor, siendo más acusada la diferencia de actividad β -galactosidasa de la fusión *PprfF2-lacZ* que la de la fusión *PprfF1-lacZ*. A pesar de que ambos ARNp tienen una secuencia y un tamaño muy similares (116 nt en PrrF1 y 114 nt en PrrF2; 80% de identidad de secuencia), no sabemos qué genes regula cada uno de ellos, ni si su función podría solapar en algunos casos. Puede que *PprfF1* responda más sutilmente a la variación de la concentración de hierro en el medio como parte de un mecanismo que garantice niveles de PrrF1-F2 suficientes para que, en condiciones en las que falle la regulación mediante Fur, asegurar que los genes que codifican proteínas que necesitan alta demanda de hierro no queden completamente desregulados. En *Yersinia pestis* se han descrito diferencias en la regulación de los ARNp RyhB1 y RyhB2 (homólogos del ARN de *E. coli* RyhB); mientras que la estabilidad de RyhB1 es dependiente de Hfq, la de RyhB2 no lo es (Oglesby-Sherrouse and Murphy, 2013). En *P. putida* tanto la abundancia de PrrF1 como la de PrrF2 están afectadas por la ausencia de Hfq, pero no pueden descartarse de momento otras diferencias entre ambos ARNp.

Conviene resaltar que, si bien hemos verificado que Hfq afecta a los niveles de los ARNp PrrF1 y PrrF2, la regulación de la homeostasis del hierro es un proceso muy complejo donde podrían participar más ARNp, no todos ellos descritos, cuya estabilidad podría

depender de Hfq. Algunos buenos candidatos son Pit156, un posible regulador de los genes *fecA-fecR*-PP4611, y los ARNp Pat310, Pat 323, Pat 178 y Pat335, que son ARNp antisentido de los genes *pvdA*, *pvdE*, *fpvA* y *fur*, respectivamente (Bojanovic et al., 2017); sin embargo, queda pendiente confirmar su existencia, así como su implicación en el metabolismo del hierro y relación con la proteína Hfq.

❖ Efecto conjunto de la ausencia de Hfq y Crc: Desde hace tiempo en el laboratorio se tenían indicios de que el efecto de la mutación doble *hfq crc* (estirpe KTHC) es mayor que el de mutar sólo *crc*, o sólo *hfq*, dado que en el mutante doble se ve afectada la expresión de muchos más genes que en cada uno de los mutantes sencillos, y el fenotipo es diferente en algunos casos. En esta tesis hemos observado que la motilidad tipo *swimming* de los mutantes *crc* (KTVC) y *hfq* (KT2440 Δ *hfq*) es ligeramente menor a la de la estirpe silvestre KT2440, mientras que el mutante doble *hfq crc* (KTHC) carece por completo de motilidad tipo *swimming* en todas las condiciones analizadas. Aunque no hemos analizado en detalle los motivos subyacentes a este comportamiento, en estudios previos se ha descrito que el mutante *hfq* es menos mótil que la estirpe parental, debido a un desequilibrio en la disponibilidad de ATP de la célula (Arce-Rodríguez et al., 2015). Es sensato pues suponer que el desbalance metabólico que el mutante KTHC sufre, debido a la falta simultánea de Hfq y Crc, acrecienta este problema.

Se confirma por tanto, que el fenotipo del mutante doble KTHC es diferente al del mutante KT2440 Δ *hfq*, como se esperaría que ocurriese si la proteína Crc solamente actuara junto con Hfq. Esto nos hace plantearnos de nuevo la existencia de una tercera proteína implicada en el mecanismo conjunto de Crc y Hfq capaz de sustituir parcialmente a Crc o Hfq cuando una de ellas está ausente, pero no a ambas a la vez; sin embargo, como ya hemos comentado previamente, actualmente no existe ningún candidato. Otra posibilidad sería que Crc y Hfq regulasen conjuntamente algún otro regulador de manera que el nivel de expresión de este regulador se alterase cuando faltase Crc o Hfq, pero estaría mucho más afectado cuando las dos proteínas estén ausentes; sin embargo, tampoco se tienen candidatos en la actualidad. Queda pues pendiente la pregunta de a qué es debido el efecto aditivo observado en el mutante doble *hfq crc*.

7. CONCLUSIONES

El trabajo descrito a lo largo de esta tesis doctoral ha proporcionado las conclusiones que se detallan a continuación:

1. El ARNp CrcZ se puede originar a partir de su propio promotor *PcrcZ* pero también a partir del promotor del gen anterior, *cbrB*. La transcripción desde *PcbrB* da lugar a un transcrito largo que incluye a *crcZ*, y que posteriormente es procesado, generando una forma de CrcZ procesada, CrcZ*. El procesamiento del transcrito largo *cbrB-crcZ* tiene lugar en una zona próxima al inicio de transcripción de *PcrcZ*, por lo que CrcZ y CrcZ* son muy similares en tamaño y secuencia.
2. El promotor *PcbrB* requiere de una región de 220 – 290 nucleótidos posteriores al inicio de traducción de *cbrB* para alcanzar su máxima actividad, que incluye algunas zonas ricas en C+G que podrían tener algún papel en el efecto observado. El mecanismo molecular subyacente aún no se conoce.
3. Los mutantes traduccionales de *cbrB* que incorporan codones de terminación al principio (mutante KTB1) o en el último tercio de CbrB (mutante KTB340), no producen CrcZ primario, ni CrcZ* procesado. Sin embargo, parecen presentar fenotipos diferentes en lo que se refiere a su crecimiento en distintas fuentes de carbono, sugiriendo que la proteína CbrB trunca puede ser parcialmente activa.
4. La estirpe KT2440 utilizada en nuestro laboratorio desde 1988 ha sufrido una delección espontánea de los genes comprendidos entre PP2225 y PP2259, lo cual afecta ligeramente a la velocidad de crecimiento de la bacteria en algunas fuentes de carbono, y a la motilidad tipo *swimming*. A esta variante de KT2440 la hemos llamado KT2440-FR.
5. La comparación del transcriptoma de los mutantes *crc*, *hfq* y *hfq crc* en medio mínimo con succinato como única fuente de carbono ha permitido definir los papeles de Hfq y Crc en esta condición. Se ha comprobado que el papel de Crc en una situación con baja represión catabólica es pequeño y seguramente indirecto, mientras que Hfq ejerce amplias funciones reguladoras, siendo la más llamativa la regulación de la homeostasis del hierro.
6. En un medio mínimo con succinato como única fuente de carbono, la inactivación de *hfq* desregula la homeostasis del hierro. En este mutante los genes implicados en la biosíntesis del sideróforo pioverdina se expresan menos que en la estirpe silvestre, y como consecuencia de ello, la producción de pioverdina es menor.

7. A pesar de que el mutante *hfq* produce menos pioverdina, los niveles intracelulares de hierro son similares a los de la cepa silvestre, independientemente de que la disponibilidad de hierro en el medio sea alta o baja, probablemente gracias al aumento de expresión de los genes implicados en su captación, como *exbB-exbD-tonB* y los genes que codifican para algunos receptores de pioverdina.
8. En el mutante *hfq* la abundancia del regulador Fur no cambia y los niveles intracelulares de hierro se mantienen en valores similares a los de la estirpe parental. Sin embargo, la cantidad de los ARNp PrrF1-F2 se reduce 3 veces, presuntamente debido a un descenso de su estabilidad, hecho que influye en la alteración del metabolismo del hierro.
9. La ausencia simultánea de Crc y Hfq afecta a la expresión de un número mayor de genes que la ausencia de cada proteína por separado, lo que lleva a que el mutante doble presente algunos fenotipos que no se aprecian en los mutantes sencillos. Por ejemplo, la motilidad de tipo *swimming* es mucho menor en el mutante doble que en los mutantes sencillos. Esto hace pensar que el modelo actual de funcionamiento de Crc y Hfq podría ser más complejo de lo que se piensa.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdou L., Chou HT., Haas D. and Lu CD. (2011) Promoter recognition and activation by the global response regulator CbrB in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, **193**(11): 2784 – 2792
- Aiba H. (2007) Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr Opin Microbiol.*, **10**(2): 134 – 139
- Amador C.I., Canosa I., Govantes F. and Santero E. (2010) Lack of CbrB in *Pseudomonas putida* affects not only amino acids metabolism but also different stress responses and biofilm development. *Environ Microbiol.*, **12**(6): 1748 – 1761
- Amador C.I., López-Sánchez A., Govantes F., Santero E. and Canosa I. (2016) A *Pseudomonas putida* *cbrB* transposon insertion mutant displays a biofilm hyperproducing phenotype that is resistant to dispersal. *Environ Microbiol Rep.*, **8**(5): 622 – 629
- Anders S., Pyl P.T. and Huber W. (2015) HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**: 166 – 169
- Andrews S.C., Robinson A.K. and Rodríguez-Quñones F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev.*, **27**(2-3): 215 – 237
- Aranda-Olmedo I., Martín P., Ramos J.L. and Marqués S. (2006) Role of the *ptsN* gene product in catabolite repression of the *Pseudomonas putida* TOL toluene degradation pathway in chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol.*, **72**(11): 7418 – 7421
- Arce-Rodríguez A., Calles B., Nikel P.I. and de Lorenzo V. (2015). The RNA chaperone Hfq enables the environmental stress tolerance superphenotype of *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.*, doi: 10.1111/1462-2920.13052
- Bagdasarian M., Lurz R., Ruckert B., Franklin F.C., Bagdasarian M.M., Frey J. and Timmis K.N. (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*, **16**: 237 – 247
- Bastiaansen K.C., Otero-Asma J., Luirink J., Bitter W. and Llamas M.A. (2015) Processing of cell-surface signalling anti-sigma factors prior to signal recognition is a conserved autoproteolytic mechanism that produces two functional domains. *Environmental Microbiology*: doi 10.1111/1462-2920.1277
- Bauchop T. and Elsden S.R. (1960). The growth of micro-organisms in relation to the energy supply. *J Gen Microbiol.*, **23**: 457 – 469
- Bayse C., Matthijs S., Pattery T. and Cornelis P. (2001) Impact of mutations in *hemA* and *hemH* genes on pyoverdine production by *Pseudomonas fluorescens* TCC17400. *FEMS Microbiol Lett.*, **205**(1): 57 – 63
- Belda E., van Heck R.G.A., López-Sánchez M.J., Cruveiller S., Barbe V., Fraser C., Klenk H.P., Petersen J., Morgat A., Nikel P.I., Vallenet D., Rouy Z., Sekowska A., Martins dos Santos V.A.P., de Lorenzo V., Danchin A. and Médigue C. (2016) The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. *Environ Microbiol.*, **18**: 3403 – 3424
- Berger D.K., Narberhaus F. and Kustu S. (1994) The isolated catalytic domain of NIFA, a bacterial enhancerbinding protein, activates transcription *in vitro*: activation is inhibited by NIFL. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 103 – 107
- Bojanovic K., D'Arrigo I. and Long K.S. (2017) Global transcriptional responses to osmotic, oxidative, and imipenem stress conditions in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol.*, **83**(7). pii: e03236-16. doi: 10.1128/AEM.03236-16

- Boyer H. and Roulland-Dussoix D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.*, **41**(3): 459 – 472
- Braud A., Geoffroy V., Hoegy F., Mislin G.L. and Schalk I.J. (2010) Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environ Microbiol Rep.*, **2**(3): 419 – 425
- Calb R., Davidovitch A., Koby S., Giladi H., Goldenberg D., Margalit H., Holtel A., Timmis K., Sánchez-Romero J.M., de Lorenzo V. and Oppenheim A.B. (1996) Structure and function of the *Pseudomonas putida* integration host factor. *J Bacteriol.*, **178**(21): 6319 – 6326
- Cases I., Pérez-Martín J. and de Lorenzo V. (1999) The IIA^{Ntr} (PtsN) protein of *Pseudomonas putida* mediates the C source inhibition of the sigma54-dependent Pu promoter of the TOL plasmid. *J Biol Chem.*, **274**(22): 15562 – 15568
- Cases I., Lopez J.A., Albar and de Loenzo (2001a) Evidence of multiple regulatory functions for the PtsN (IIA(Ntr)) protein of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.*, **183**(3): 1032 – 1037
- Cases I., Velázquez F. and de Lorenzo V (2001b) Role of *ptsO* in carbon-mediated inhibition of the Pu promoter belonging to the pWW0 *Pseudomonas putida* plasmid. *J Bacteriol.*, **183**(17): 5128 – 5133
- Cases I., Ussery D.W. and de Lorenzo V. (2003) The σ^{54} regulon (sigmulon) of *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.*, **2**:12: 1281 – 1293
- Cases I. Velázquez F. and de Lorenzo V. (2007) The ancestral role of the phosphoenolpyruvate–carbohydrate phosphotransferase system (PTS) as exposed by comparative genomic. *Res Microbiol.*, **158**(8-9): 666 – 670
- Collier D.N., Hager P.W., Phibbs P.V. (1996) Catabolite repression control in the Pseudomonads. *Res Microbiol.*, **147**: 551 – 561
- Cornelis P. and Matthijs S. (2002) Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ Microbio.*, **4**(12): 787 – 798
- Cornelis P., Matthijs S., and Van Oeffelen L. (2009) Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals* **22**: 15 – 22
- Cornelis P. (2010) Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1637 – 1645
- Cornelis P., Wei K., Andrews S.C. and Vinckxa T. (2011) Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics*, **3**(6): 540 – 549
- Cornelis P. and Dingemans J. (2013) *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol.*, **3**: 75. doi: 10.3389/fcimb.2013.00075
- Corona F. (2017) Impacto del regulador global Crc en la fisiología de *P. aeruginosa* (Doctoral thesis, Universidad Autónoma de Madrid, España).
- Chakraborty R. (2013) Ferric siderophore transport via outer membrane receptors of *Escherichia coli*: structural advancement and a tribute to Dr. Dick van der Helman ‘ironman’ of siderophore biology, p 1–29. In Chakraborty R., Braun V., Hantke K., Cornelis P. (2013), Iron uptake in bacteria with emphasis on *E. coli* and *Pseudomonas*. Springer, New York, NY.

- Chaneyre S. and Mandin P. (2018) Bacterial iron homeostasis regulation by sRNAs. *Microbiol Spectr.*, **6**(2): doi: 10.1128/microbiolspec.RWR-0010-2017.
- Cunrath O., Geoffroy V.A. and Schalk I.J. (2015) Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*: a role for siderophores. *Environ. Microbiol.*, **18**(10): 3258 – 3267
- D'Arrigo I., Bojanovic K., Yang X., Holm Rau M. and Long K.S. (2016) Genome-wide mapping of transcription start sites yields novel insights into the primary transcriptoma of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol.*, **18**(10): 3466 – 3481
- De Lay N., Schu D. and Gottesman S. (2013) Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices. *J Biol Chem.*, **288**(12): 7996 – 8003
- De Lorenzo V. and Timmis K.N. (1994). Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.*, **235**: 386 – 405
- Desnoyers G., Morissette A., Prevost K. and Masse E. (2009) Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA *iscRSUA*. *EMBO J.*, **28**: 1551 – 1561
- Dinamarca M.A., Ruíz-Manzano A. and Rojo F. (2002) Inactivation of cytochrome o ubiquinol oxidase relieves catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPO1 alkane degradation pathway. *J. Bacteriol.*, **184**(14): 3785 – 3793
- Dinamarca M.A., Aranda-Olmedo I., Puyet A. and Rojo F. (2003) Expression of the *Pseudomonas putida* OCT plasmid alkane degradation pathway is modulated by two different global control signals: Evidence from continuous cultures. *J. Bacteriol.*, **185**(16): 4772 – 4778
- Escolar L., Pérez-Martín J. and de Lorenzo V. (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol.*, **181**(20): 6223 – 6229
- Federal Register. Appendix E (1982) Certified host-vector systems **47**: 17197
- Filiatrault M.J., Stodghil P.V., Wilson J., Butcher B.G., Chen H., Myers C.R. and Cartinhour S.W. (2013) CrcZ and CrcX regulate carbon source utilization in *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato* strain DC3000. *RNA Biol.* **10**(2): 245 – 255
- Figurski D. and Helinski D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**(4): 1648 – 1652
- Fonseca P., Moreno R. and Rojo F. (2013). *Pseudomonas putida* growing at low temperature shows increased levels of CrcZ and CrcY sRNAs, leading to reduced Crc-dependent catabolite repression. *Environ. Microbiol.*, **15**: 24 – 35
- Franze de Fernandez M.T., Eoyang L. and August J.T. (1968) Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Q β -RNA. *Nature*, **219**: 588 – 590
- Franklin F.C., Bagdasarian M., Bagdasarian M.M. and Timmis K.N. (1981). Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**: 7458 – 7462
- García-Mauriño S.M., Pérez-Martínez I., Amador C.I., Canosa I. and Santero E. (2013). Transcriptional activation of the CrcZ and CrcY regulatory RNAs by the CbrB response regulator in *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.*, **89**: 189 – 205

- Ghysels B., Dieu B.T., Beatson S.A, Pirnay J.P., Ochsner U.A., Vasil M.L. and Cornelis P. (2004) FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. **150**(Pt 6): 1671 – 1680
- Gómez-Lozano M., Marvig R.L., Molina-Santiago C., Tribelli P.M., Ramos J.L. and Møllin S. (2015) Diversity of small RNAs expressed in *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol Rep.*, **7**(2): 227 – 236
- Göpel Y., Khan M.A. and Görke B. (2016) Domain swapping between homologous bacterial small RNAs dissects processing and Hfq binding determinants and uncovers an aptamer for conditional RNaseE cleavage. *Nucleic Acids Res.*, **44**(2): 824 – 837
- Görke B. and Stülke J. (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol.*, **6**(8): 613 – 624
- Grant S.N., Jesse J., Bllom F.R. and Hanahan D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87**: 4645 – 4649
- Gross H. and Loper J.E (2009) Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas spp.* *Nat Prod Rep.*, **26**(11): 1408 – 1446
- Hanahan D. and Meselson M. (1983). Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.*, **100**: 33 – 42
- Hatoum A. and Roberts J. (2008) Prevalence of RNA polymerase stalling at *Escherichia coli* promoters after open complex formation. *Mol Microbiol.*, **68**: 17 – 28
- Heckman K.L. and Pease L.R. (2007) Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc.*, **2**(4): 924 – 32
- Heeb S., Blumer C., and Haas D. (2002) Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol.*, **184**: 1046 – 1056
- Hernández-Arranz S., Moreno R., and Rojo F. (2013) The translational repressor Crc controls the *Pseudomonas putida* benzoate and alkane catabolic pathways using a multi-tier regulation strategy. *Environ. Microbiol.*, **15**: 227 – 241
- Hernández-Arranz S., Sánchez-Hevia D.L., Rojo F. and Moreno R. (2016) Effect of Crc and Hfq proteins on the transcription, processing, and stability of the *Pseudomonas putida* CrcZ sRNA. *RNA*. **22**(12): 1902 – 1917
- Herrero M., de Lorenzo V. and Timmis K.N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J Bacteriol.*, **172**: 6557 – 67
- Huala E. and Ausubel F.M. (1989) The central domain of *Rhizobium meliloti* NifA is sufficient to activate transcription from the *R. meliloti* nifH promoter. *J Bacteriol* **171**: 3354 – 3365
- Huala E., Stigter J., and Ausubel F.M. (1992) The central domain of *Rhizobium leguminosarum* DctD functions independently to activate transcription. *J Bacteriol* **174**: 1428 – 1431
- Iost I. and Dreyfus M. (1995) The stability of *Escherichia coli* lacZ mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO*, **14**(13): 3252 – 3261

- Joly N. Zhang N. and Buck M. (2012) ATPase site architecture is required for self-assembly and remodeling activity of a hexameric AAA+ transcriptional activator. *Mol Cell.*, **47**(3): 484 – 490
- Kaberlin V.R. and Bläsi U. (2006) Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs. *FEMS Microbiol Rev.*, **30**(6): 967 – 979
- Kim J., Oliveros J.L., Nikel P.I., de Lorenzo V. and Silva-Rocha R. (2013) Transcriptomic fingerprinting of *Pseudomonas putida* under alternative physiological regimes. *Environ Microbiol Rep.* **5**(6): 883 – 891
- Knaus R. and Bujard H. (1988) P_L of coliphage lambda: an alternative solution for an efficient promoter. *EMBO J.* **7**: 2919 – 2923
- Kojima Y., Fujisawa H., Nakazawa A., Nakazawa T., Kanetsuna F., Taniuchi H., Nozaki M. and Hayaishi O. (1967) Studies on pyrocatechase. I. Purification and spectral properties. *J Biol Chem* **242**: 3270 – 3278
- Köhler T., Harayama S., Ramos J.L. and Timmis K.N. (1989). Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN σ factor in regulation of various metabolic functions. *J. Bacteriol.*, **171**: 4326 – 4333
- Krewulak K.D. and Vogel H.J. (2008) Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim Biophys Acta.*, **1778**(9): 1781 – 1804
- Langmead B. and Salzberg S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.*, **9**(4): 357 – 359
- Lau C.K., Krewulak K.D. and Vogel H.J. (2016) Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiol Rev.*, **40**(2): 273 – 298
- La Rosa R., Nogales J. and Rojo F. (2015). The Crc/CrcZ-CrcY global regulatory system helps the integration of gluconeogenic and glycolytic metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.*, **17**: 3362 – 3378
- Li W. and Lu C.D. (2007) Regulation of carbon and nitrogen utilization by CbrAB and NtrBC two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, **189**(15): 5413 – 5420
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G. and Durbin R. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, **25**: 2078 – 2079
- Linares J.F., Moreno R., Fajardo A., Martínez-Solano L., Escalante R., Rojo F. and Martínez JL. (2010) The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.*, **12**(12): 3196 – 3212
- Livak K.J. and Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods.*, **25**: 402 – 08
- Llamas M.A., Sparrius M., Kloet R., Jiménez C.R., Vandenbroucke-Grauls C. and Bitter W. (2006) The heterologous siderophores ferrioxamine B and ferrichrome activate signaling pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, **188**(5): 1882 – 1891
- Llamas M.A. and Bitter W. (2010) Cell-Surface Signalling in *Pseudomonas*. In *Pseudomonas* volume 6: Molecular Microbiology, Infection and Biodiversity, p 55 – 59. Ramos J., Filloux A. (eds) *Pseudomonas*. Springer, Dordrecht
- Llamas M.A, Imperi F., Visca P. and Lamont I.L. (2014) Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress responses, iron transport and pathogenicity. *FEMS Microbiol Rev.*, **38**(4): 569 – 597

- López-Sánchez A., Jiménez-Fernández A.I., Calero P., Gallego L. D. and Govantes F. (2013) New methods for the isolation and characterization of biofilm-persistent mutants in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.*, **5**(5): 679 – 685
- López-Serra P., Marcilla M., Villanueva A., Ramos-Fernández A., [...] and Esteller M. (2014) A DERL3-associated defect in the degradation of SLC2A1 mediates the Warburg effect. *Nat Commun* **5**: 3608. doi: 10.1038/ncomms4608.
- Madhushani A., Del Peso-Santos T., Moreno R., Rojo F. and Shingler V. (2015) Transcriptional and translational control through the 5'-leader region of the *dmpR* master regulatory gene of phenol metabolism. *Environ Microbiol.*, **17**(1): 119 – 133
- Magdalani N., Vanderpool C. and Gottesman S. (2005) Bacterial small RNA regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, **40**(2): 93 – 113
- Martínez-Bueno M.A., Tobes R., Rey M. and Ramos J.L. (2002) Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environ. Microbiol.*, **4**(12): 842 – 855
- Martínez-García E. and de Lorenzo V. (2011) Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.*, **13**(10): 2702 – 2716
- Martínez-García, E., Jatsenko, T., Kivisaar, M. and de Lorenzo, V. (2015a) Freeing *Pseudomonas putida* KT2440 of its proviral load strengthens endurance to environmental stresses. *Environ Microbiol.*, **17**: 76 – 90
- Martínez-García E., Aparicio T., Goñi-Moreno A., Fraile S. and de Lorenzo V. (2015b). SEVA 2.0: an update of the Standard European Vector Architecture for de-/re-construction of bacterial functionalities. *Nucleic. Acids Res.*, **43**: D1183–D1189
- Massé E., Escorcia F.E. and Gottesman S. (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, **17**: 2374-2383
- Massé E. and Arguin M. (2005) Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Trends Biochem Sci.*, **30**(8): 462 – 468
- Matilla M.A, Ramos J.L, Duque E., Alché J.D, Espinosa-Urgel M. and Ramos-González M.I. (2007) Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol.*, **9**(7): 1842 – 1850
- Matthijs S, Laus G, Meyer JM, Abbaspour-Tehrani K, Schäfer M, Budzikiewicz H. and Cornelis P. (2009) Siderophore-mediated iron acquisition in the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* L48 and its close relative *Pseudomonas putida* KT2440. *Biometals*, **22**: 951 – 964
- Maxam A.M. and Gilbert W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods. Enzymol.*, **65**: 499 – 560
- McHugh J.P., Rodríguez-Quinoñes F., Abdul-Tehrani H., Svistunenko D.A., Poole R.K., Cooper C.E. and Andrews S.C. (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*: A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem.*, **278**(32): 29478 – 29486
- Mey A.R., Craig S.A. and Payne S.A. (2005) Characterization of *Vibrio cholerae* RyhB: the RyhB regulon and role of *ryhB* in biofilm formation. *Infect Immun.*, **73**(9): 5706 – 5719

- Mikulecky P.J., Kaw M.K., Brescia C.C, Takach J., Sledjeski D.D. and Feig A.L. (2004) *Escherichia coli* Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**(12): 1206 – 1214
- Miller J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Press*
- Milojevic T., Grishkovskay I., Sonnleitner E., Dijinovic-Carugo K. and Bläsi U. (2013) The *Pseudomonas aeruginosa* catabolite repression control protein Crc is devoid of RNA binding activity. *PLoS One*. **8**(5):e64609
- Molina M.A, Godoy P., Ramos-González M.I., Muñoz N., Ramos J.L. and Espinosa-Urgel M. (2005) Role of iron and the TonB system in colonization of corn seeds and roots by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol.*, **7**(3): 443 – 449
- Monod J. (1942). Recherches sur la croissance des Cultures bactériennes, Paris.
- Morales G., Linares J.F., Beloso A., Albar J.P., Martínez J.L. and Rojo F. (2004) The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *J. Bacteriol.*, **186**: 1337 – 1344
- Morales G., Ugidos A. and Rojo F. (2006). Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome o ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and *cbb3-1* terminal oxidases. *Environ. Microbiol.*, **8**: 1764 – 1774
- Moreno R., Ruiz-Manzano A., Yuste L. and Rojo F. (2007). The *Pseudomonas putida* Crc global regulator is an RNA binding protein that inhibits translation of the AlkS transcriptional regulator. *Mol. Microbiol.*, **64**: 665 – 75
- Moreno R., Martínez-Gomariz M., Yuste L., Gil C. and Rojo F. (2009a) The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the hierarchical assimilation of amino acids in a complete medium: evidence from proteomic and genomic analyses. *Proteomics* **9**: 2910 – 2928
- Moreno R., Marzi S., Romby P. and Rojo F. (2009b) The Crc global regulator binds to an unpaired A-rich motif at the *Pseudomonas putida alkS* mRNA coding sequence and inhibits translation initiation. *Nucleic Acids Res.* **37**(22): 7678 – 7690
- Moreno R., Fonseca P. and Rojo F. (2012). Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression. *Mol Microbiol.*, **83**: 24 – 40
- Moreno R., Hernández-Arranz S., La Rosa R., Yuste L., Madhushani A., Shingler V. and Rojo F. (2015). The Crc and Hfq proteins of *Pseudomonas putida* cooperate in catabolite repression and formation of ribonucleic acid complexes with specific target motifs. *Environ. Microbiol.*, **17**(1): 105 – 118
- Morita T., Kami K. and Aiba H. (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev.*, **19**(18): 2176 – 2186
- Münch R., Hiller K., Grote A., Scheer M., Klein J., Schobert M. and Jahn D. (2005) Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics*. **21**(22): 4187 – 4189
- Naville M., Chuillot-Gaudeffroy A., Marchais A. and Gautheret D. (2011) ARNold: A web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators. *RNA Biol.* **8**(1): 11 – 13

- Nelson K.E., Weinel C., Paulsen I.T., Dodson R.J., Hilbert H., Martins dos Santos V.A.P., [...] and Fraser C.M. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol*, **4**: 799 – 808
- Nikulin A., Stolboushkina E., Perederina A., Vassilieva I., Blaesi U., Moll I., Kachalova G., Yokoyama S., Vassilyev D., Garber M. and Nikonov S. (2005). Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq protein. *Acta Cryst.*, **D61**: 141 – 146
- Nishijyo T., Haas D. and Itoh Y. (2001) The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.*, **40**(4): 917 – 931
- Ochsner U.A., Johnson Z. and Vasil M.L. (2000) Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. **146**: 185 – 198
- Oglesby-Sherrouse A.G. and Murphy E.R. (2013) Iron-responsive bacterial small RNAs: variations on a theme. *Metallomics*. **5**: 276 – 286
- Oliveros J.C. (2007). FIESTA@BioinfoGP. An interactive server for analysing DNA microarrays experiments with replicates. URL <http://bioinfoGP.cnb.csic.es/tools/FIESTA>
- Panja S. and Woodson A. (2012) Hexamer to monomer equilibrium of *E. coli* Hfq in solution and its impact on RNA annealing. *J Mol Biol.*, **417**(5): 406 – 412
- Petra P., Tata M., Wolfinger M.T. Sonnleitner E., Häussler S. and Bläsi U. (2016) Cross-regulation by CrcZ RNA controls anoxic biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep.*, **6**: 39621. doi: 10.1038/srep39621
- Petruschka L., Burchhardt G., Müller C. Weihe C. and Herrmann H. (2001) The *cyo* operon of *Pseudomonas putida* is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation. *Mol Genet Genomics.*, **266**(2): 199 – 206
- Porrúa O., García-González V., Santero E., Shingler V. and Govantes F. (2009) Activation and repression of a σ^N -dependent promoter naturally lacking upstream activation sequences. *Mol Microbiol.*, **73**(3): 419 – 433
- Py B. and Barras F. (2010) Building Fe–S proteins: bacterial strategies. *Nat Rev Microbiol.*, **8**(6): 436 – 446
- Quiroz-Rocha E., Moreno R., Hernández-Ortíz A., Fragoso-Jiménez J.C., Muriel-Millán L.F., Guzmán J., Espín G., Rojo F. and Núñez C. (2017) Glucose uptake in *Azotobacter vinelandii* occurs through a GluP transporter that is under the control of the CbrA/CbrB and Hfq-Crc systems. *Sci Rep.*, **12**(1): 858. doi: 10.1038/s41598-017-00980-5
- Ramos-Fernández A., Paradela A., Navajas R. and Albar J.P. (2008) Generalized method for probability-based peptide and protein identification from tandem mass spectrometry data and sequence database searching. *Mol Cell Proteomics.*, **7**: 1748 – 1754
- Ravel J. and Cornelis P. (2003) Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol.*, **11**(5): 195 – 200
- Reichenbach C., Göpel Y. and Görke B. (2009) Dual control by perfectly overlapping σ^{54} - and σ^{70} -promoters adjusts small RNA GlmY expression to different environmental signals. *Mol Microbiol.*, **74**(5): 1054 – 1070

- Reinhart A.A., Powell D.A., Nguyen A.T., O'Neill M., Djapgne L., Wilks A., Ernst R.K. and Oglesby-Sherrouse A.G. (2015) The prrF-encoded small regulatory RNAs are required for iron homeostasis and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.*, **83**(3): 863 – 875
- Robinson M.D., McCarthy D.J. and Smyth G.K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, **26**: 139 – 140
- Robinson J.T., Thorvaldsdottir H., Winckler W., Guttman M., Lander E.S., Getz G. and Mesirov J.P. (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**: 24 – 26
- Rojo F. (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 658–684
- Romsang A., Duang-Nkern J., Leesukon P., Saninjuk K., Vattanaviboon P. and Mongkolsuk S. (2014) The Iron-sulphur cluster biosynthesis regulator IscR contributes to iron homeostasis and resistance to oxidants in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE.*, **9**(1): e86763
- Ruiz-Manzano A., Yuste L. and Rojo F. (2005) Levels and activity of the *Pseudomonas putida* global regulatory protein Crc vary according to growth conditions. *J. Bacteriol.*, **187**(11): 3678 – 3686
- Runyen-Janecky L.J. (2013) Role and regulation of heme iron acquisition in gram-negative pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **3**(55): doi: 10.3389/fcimb.2013.00055
- Sahu B. (2009) Catabolite repression control in the antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae*. (Doctoral thesis, Jawaharlal Nehru University, India)
- Sambrook J. and Russell D.W., (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. N.Y.: Cold Spring Harbor.
- Sauer E. (2013) Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq. *RNA Biol.*, **10**(4): 610 – 618
- Sauer E., Schmidt S. and Weichenrieder O. (2013) Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **109**(24): 9396 – 9401
- Schalk I.J. and Cunrath O. (2016) An overview of the biological metal uptake pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.*, **18**(10): 3227 – 3246
- Schalk I.J. and Guillon L. (2013) Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids.*, **44**(5): 1267 – 1277
- Schwartz C.J., Giel J.L., Patschkowski T., Luther C., Ruzicka F.J., Beinert H. and Kiley P.J. (2001) IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **98**: 14895 – 14900
- Sheidy D.T. and Zeilke R.A. (2013) Analysis and expansion of the role of the *Escherichia coli* protein ProQ. *PLoS One*, **8**(10): e79656
- Silva-Rocha F., Chavarría M., Kleijn R.J., Sauer U. and de Lorenzo V. (2013) The IHF regulon of exponentially growing *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol.*, **15**(1): 48 – 60

- Smirnov A., Wang C., Drewry L.L. and Vogel J. (2017) Molecular mechanism of mRNA repression in trans by a ProQ-dependent small RNA. *EMBO J.*, **36**(8): 1029 – 1045
- Sonnleitner E., Hagens S., Roseanau F., Wihelm S., Habel A., Jägel K.E. and Bläsi U. (2003) Reduced virulence of a *hfq* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb Pathog.*, **35**(5): 217 – 228
- Sonnleitner E., Schuster M., Sorger-Domenigg T., Greenberg E.P. and Bläsi U. (2006) Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.*, **59**(5): 1542 – 1558
- Sonnleitner E., Sorger-Domenigg T., Madej M.J., Findeiss S., Hackermüller J., Hüttenhofer A., Stadler P.F, Bläsi U. and Moll I. (2008) Detection of small RNA in *Pseudomonas aeruginosa* by RNomics and structure-based bioinformatics tools. *Microbiology*, **154**(Pt 10): 3175 – 3187
- Sonnleitner E., Abdou L. and Haas D. (2009) Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106**(51): 21866 – 21871
- Sonnleitner E., Valentini M., Wenner N., el Zahar Haichar F., Haas D. and Lapouge K. (2012) Novel targets of the CbrAB/Crc carbon catabolite control system revealed by transcript abundance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, **7**(10): e44637
- Sonnleitner E. and Bläsi U. (2014) Regulation of Hfq the RNA CrcZ in *Pseudomonas aeruginosa* carbon catabolite repression. *PLoS Genet.*, **10**(6): e1004440
- Sonnleitner E., Konstantin P. and Bläsi U. (2017a) The *Pseudomonas aeruginosa* CrcZ RNA interferes with Hfq-mediated riboregulation. *PLoS One*. **12**(7): e0180887
- Sonnleitner E., Wulf A., Capagne S., Pei X-Y, Wolfinger M-T., Forlani G., Prindl K., Abdou L., Resch A., Allain F., Luisi B.F., Urlaub H. and Bläsi U. (2017b) Interplay between the catabolite repression control protein Crc, Hfq and RNA in Hfq-dependent translational regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* **13**: doi: 10.1093/nar/gkx1245
- Spaink H.P., Okker R.J., Wihffelman C.A., Pees E. and Lugtenberg B.J. (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol.*, **9**(1): 27 – 39
- Stanier R.Y., Palleroni N.J. and Doudoroff M. (1966) The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol.*, **43**(2): 159 – 271
- Storz G., Vogel J. and Wassarman K.M. (2011) Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell.*, **43**(6): 880 – 891
- Taguchi K., Fukutomi H., Kuroda A., Kato J. and Ohtake H. (1997) Genetic identification of chemotactic transducers for amino acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. **143**(10): 3223 – 3229
- Teitzel G.M., Geddie A., De Long S.K., Kirisits M.J., Whiteley M. and Parsek M.R. (2006) Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, **188**(20): 7242 – 7265
- Thöny B. and Hennecke H. (1989) The -24/-12 promoter comes of age. *FEMS Microbiol Rev.*, **5**: 341 – 357
- Valentini M. and Lapouge K. (2013) Catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 regulates the uptake of C4-dicarboxylates depending on succinate concentration. *Environ Microbiol.*, **15**: 1707 – 1716

- Valentin-Hansen P., Eriksen M. and Udesen C. (2004) The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol.*, **51**(6): 1525 – 1533
- Valverde C., Heeb S., Keel C. and Haas D. (2003) RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Microbiol.*, **50**: 1361 – 1379
- Vasil M.L. and Ochsner U.A. (1999) The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol.*, **34**(3): 399 – 413
- Vassilieva E.M. and Garber M.B. (2002) The regulatory role of the Hfq protein in bacterial cells. *Molecular Biology*, **36**(6): 785 – 791
- Vecerek B., Moll I., Afonyushkin T., Kaberdin V. and Bläsi U. (2003) Interaction of the RNA chaperone Hfq with mRNAs: direct and indirect roles of Hfq in iron metabolism of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*, **50**(3): 897 – 909
- Velázquez F., di Bartolo I. and de Lorenzo V. (2004). Genetic evidence that catabolites of the Entner-Doudoroff pathway signal C-source repression of the sigma54 Pu promoter of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, **186**: 8267 – 8275
- Velázquez F., Pflüger K., Cases I., De Eugenio L.I. and de Lorenzo V. (2007) The phosphotransferase system formed by PtsP, PtsO, and PtsN proteins controls production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.*, **189**: 4529 – 4533
- Vogel J. and Luisi B.F. (2011) Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol.*, **9**(8): 578 – 589
- Wagner E.G. (2013) Cycling of RNAs on Hfq. *RNA Biol.*, **10**(4): 619 – 626
- Wagner E.G. and Romby P. (2015) Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do. *Adv Genet.*, **90**: 133 – 208
- Waters L.S. and Storz G. (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*. **136**(4): 615 – 628
- Watson R.J., Millichap P., Joyce S.A., Reynolds S. and Clarke D.J. (2010) The role of iron uptake in pathogenicity and symbiosis in *Photobacterium luminescens* TT01. *BMC Microbiol.*, **10**: 177. doi: 10.1186/1471-2180-10-177
- Wei H. and Aristilde L. (2015) Structural characterization of multiple pyoverdines secreted by two *Pseudomonas* strains using liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry with varying dissociation energies. *Anal Bioanal Chem.*, **407**: 4629 – 4638
- Wei Y., Zhang H., Gao Z-G., Xu J-H., Liu Q-S. and Dong Y-H. (2013) Structure analysis of the global metabolic regulator Crc from *Pseudomonas aeruginosa*. *IUBMB Life.*, **65**(1): 50 – 57
- Wessel D. and Flugge U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.*, **138**: 141 – 143
- Wilderman P.J., Sowa N.A., FitzGerald D.J., FitzGerald P.C., Gottesman S., Ochsner U.A. and Vasil M.L. (2004) Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **101**(26): 9792 – 9797

- Wolff J.A., MacGregor C.H., Eisenberg R.C. and Phibbs P.V. Jr. (1991) Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Bacteriol.*, **173**(15): 4700 – 4706
- Wong S.M. and Mekalanos J.J. (2000) Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **97**(18): 10191 – 10196
- Xu H. and Hoover T.R. (2001) Transcriptional regulation at a distance in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* **4**(2): 138 – 144
- Wu X., Monchy S., Taghavi S., Zhu W., Ramos J. and van der Lelie D. (2011) Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Rev*, **35**: 299 – 323
- Yanisch-Perron C., Vieira J. and Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**: 103-119
- Yao H., Jepkorir G., Lovell S., Nama P.V., Weerantunga S., Battaile K.P. and Rivera M. (2011) Two distinct ferritin-like molecules in *Pseudomonas aeruginosa*: The product of the *bfrA* gene is a bacterial ferritin (FtnA) not a bacterioferritina (Bfr). *Biochemistry*, **50**(23): 5236 – 5248
- Yeung A.T., Torfs E.C., Jamshidi F., Bains M., Wiegand I., Hancock R.E. and Overhage J. (2009) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *J Bacteriol.*, **191** (18) 5592 – 2602
- Yeung A.T., Bains M. and Hancock R.E. (2011) The sensor kinase CbrA Is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, **193**(4): 918 – 931
- Zhang X.X. and Rainey P.B. (2008) Dual involvement of CbrAB and NtrBC in the regulation of histidine utilization in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Genetics* **178**: 185 – 195
- Zhang X.X., Gauntlett J.C., Oldenburg D.G., Cook G.M and Rainey P.B. (2015) Role of the transporter-like sensor kinase CbrA in histidine uptake and signal transduction. *J Bacteriol.*, **197**(17): 2867 – 2678
- Zheng M., Doan B., Schneider T.D. and Storz G. (1999) OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J Bacteriol.*, **181**(15): 4639 – 4643

9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1 | Genes cuyos niveles de ARN son mayores o menores en el mutante *crc* (KTVC) que en la estirpe silvestre, en MMSc y fase exponencial (0,6 A₆₀₀). Se han seleccionados los genes cuyos niveles de ARN cambian más de ± 3 veces ($\log_2 FC \geq |1,585|$ y $FDR \leq 0,01$), indicando en rojo los que están más expresados y en verde los que están menos expresados.

ID	Símbolo	$\log_2 FC$	Descripción	Función principal
PP0204		-2,94	transcriptional regulator, GntR family	Funciones reguladoras
PP0205		-2,41	oxidoreductase, putative	Función desconocida
PP0232	<i>tauB</i>	-1,6	taurine ABC transporter, ATP-binding protein	Proteínas de transporte y unión
PP0233	<i>tauA</i>	-1,85	taurine ABC transporter, periplasmic taurine-binding	Proteínas de transporte y unión
PP0235	<i>lsfA</i>	-1,59	antioxidant protein LsfA	Procesos celulares
PP0270		-2,07	sensor histidine kinase	Funciones reguladoras
PP0272		-2,08	outer membrane ferric siderophore receptor	Proteínas de transporte y unión
PP0273		-2,39	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0397		-1,86	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0550		-1,63	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0575		-1,83	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0585		-2,06	transcriptional regulator, MerR family	Funciones reguladoras
PP0586		-1,87	heavy metal translocating P-type ATPase	Proteínas de transporte y unión
PP0588		-3,42	copper-binding protein, putative	Proteínas de transporte y unión
PP0682		1,61	conserved hypothetical protein TIGR00645	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0718		-1,77	sulfate transporter	Proteínas de transporte y unión
PP0788		-1,91	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0832	<i>queA</i>	1,73	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isom	Síntesis de proteínas
PP0838	<i>suhB</i>	1,61	extragenic suppressor protein SuhB	Función desconocida
PP0998		-1,84	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP1000	<i>argI</i>	-1,84	ornithine carbamoyltransferase, catabolic	Metabolismo energético
PP1001	<i>arcA</i>	-2,50	arginine deiminase	Metabolismo energético
PP1002	<i>arcD</i>	-1,74	arginine/ornithine antiporter	Proteínas de transporte y unión
PP1116		-2,31	site-specific recombinase, resolvase family	Metabolismo de ADN
PP1121		-2,17	OmpA family protein	Envuelta celular
PP1153		-1,59	lipoprotein, putative	Envuelta celular
PP1167	<i>dctM</i>	1,61	TRAP dicarboxylate transporter, DctM subunit, putat	Proteínas de transporte y unión
PP1291		-2,21	PhoH family protein	Función desconocida
PP1308	<i>mdeA</i>	-2,94	methionine gamma-lyase	Metabolismo energético
PP1373		1,63	low-affinity inorganic phosphate transporter	Proteínas de transporte y unión
PP1531		1,59	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP1634		1,63	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP1814		-2,12	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2010		-1,66	cytochrome b561	Metabolismo energético
PP2108		-1,85	conserved domain protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2161		-1,69	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2251		-3,01	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2260		-3,18	sugar ABC transporter, ATP-binding protein	Proteínas de transporte y unión
PP2644		-1,85	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP2645	<i>mgtB</i>	-2,04	magnesium-translocating P-type ATPase	Proteínas de transporte y unión
PP2646		-1,99	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2875		-1,85	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP2901		-1,93	penicillin amidase family protein	Procesos celulares
PP3234		-2,24	heat shock protein, HSP20 family	Procesamiento de proteínas
PP3436	<i>rarD-2</i>	2,00	rarD protein	Función desconocida
PP3441		-1,77	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP3639		-2,71	alkylhydroperoxidase AhpD domain protein	Función desconocida
PP3796		-2,47	L-ornithine N5-oxygenase	Metabolismo intermediario
PP3807		-2,60	thioesterase	Función desconocida
PP3808		-2,97	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP4007	<i>infA</i>	2,27	translation initiation factor IF-1	Síntesis de proteínas
PP4035		-1,83	transporter, NCS1 nucleoside transporter family	Proteínas de transporte y unión
PP4116	<i>aceA</i>	-2,02	isocitrate lyase	Metabolismo energético
PP4210	<i>pvdT</i>	-2,73	ABC export system, permease/ATP-binding protein, I	Proteínas de transporte y unión
PP4211	<i>ompQ</i>	-2,25	ABC export system, outer membrane protein	Proteínas de transporte y unión
PP4212	<i>pvdP</i>	-1,70	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas

PP4214	<i>pvdN</i>	-2,12	aminotransferase, class V	Función desconocida
PP4215	<i>pvdO</i>	-2,17	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP4216	<i>pvdE</i>	-3,42	pyoverdine ABC export system, permease/ATP-binding protein	Proteínas de transporte y unión
PP4218		-3,25	lipase/esterase family protein	Función desconocida
PP4219	<i>pvdD</i>	-3,62	non-ribosomal siderophore peptide synthetase	Procesos celulares
PP4220	<i>pvdJ</i>	-3,88	non-ribosomal peptide synthetase domain protein, gamma	Función desconocida
PP4221	<i>pvdI</i>	-2,52	non-ribosomal peptide synthetase	Síntesis de proteínas
PP4222	<i>syrP</i>	-3,28	syrP protein, putative	Funciones reguladoras
PP4223	<i>pvdH</i>	-3,25	diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase	Metabolismo intermediario
PP4243	<i>pvdL</i>	-2,95	pyoverdine synthetase	Síntesis de proteínas
PP4245	<i>pvdY</i>	-1,90	siderophore biosynthesis protein, putative	Proteínas de transporte y unión
PP4251	<i>ccoO-1</i>	-1,67	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II	Metabolismo energético
PP4252	<i>ccoQ-1</i>	-1,94	cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoQ subunit	Metabolismo energético
PP4253	<i>ccoP-1</i>	-2,26	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit III	Metabolismo energético
PP4278	<i>xdhA</i>	-2,38	xanthine dehydrogenase, XdhA subunit	Metabolismo energético
PP4427		-3,06	amino acid ABC transporter, permease protein	Proteínas de transporte y unión
PP4650	<i>cioB</i>	-1,70	ubiquinol oxidase subunit II, cyanide insensitive	Metabolismo energético
PP4753		-1,62	N-methylproline demethylase, putative	Metabolismo energético
PP4812		1,64	DNA-3-methyladenine glycosylase, putative	Metabolismo de ADN
PP5036		-1,70	chlorohydrolase family protein	Función desconocida
PP5211		-1,74	ChaC-related protein	Función desconocida
PP5291	<i>pyrE</i>	2,54	orotate phosphoribosyltransferase	Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos
PP5292	<i>crc</i>	-4,35	catabolite repression control protein	Funciones reguladoras
PP5307	<i>exbD</i>	1,85	ferric siderophore transport system, inner membrane protein	Proteínas de transporte y unión
PP5389		-1,71	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP5393		-3,00	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas

Tabla S2 | Genes cuyos niveles de ARN son mayores o menores en el mutante *hfq* (KT2440Δ*hfq*) que en la estirpe silvestre, en MMScc y fase exponencial (0,6 A₆₀₀). Se han seleccionado los genes cuyos niveles de ARN cambian más de ± 3 veces ($\log_2FC \geq |1,585|$ y $FDR \leq 0,01$), indicando en rojo los que están más expresados y en verde los que están menos expresados.

ID	Símbolo	\log_2FC	Descripción	Función principal
PP0057		2,17	major facilitator family transporter	Proteínas de transporte y unión
PP0126		-1,84	cytochrome c4	Metabolismo energético
PP0154		-1,99	acetyl-CoA hydrolase/transferase family protein	Metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos
PP0161	<i>foxR</i>	2,55	transmembrane sensor, putative	Funciones reguladoras
PP0181		-1,76	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0238	<i>ssuD</i>	1,94	organosulfonate monooxygenase	Metabolismo intermediario
PP0267		2,91	outer membrane ferric siderophore receptor, putative	Proteínas de transporte y unión
PP0273		-3,09	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0275		1,87	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0351	<i>fiuR</i>	2,34	transmembrane sensor protein, putative	Función desconocida
PP0430		-1,75	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0482	<i>bfrα</i>	-3,40	bacterioferritin	Proteínas de transporte y unión
PP0490		-1,68	formate dehydrogenase, iron-sulfur subunit	Metabolismo energético
PP0504	<i>oprG</i>	-2,24	outer membrane protein OprG	Envuelta celular
PP0544		2,52	ethanolamine transporter	Proteínas de transporte y unión
PP0552	<i>adh</i>	4,85	2,3-butanediol dehydrogenase	Metabolismo energético
PP0553	<i>acoC</i>	5,32	acetoin dehydrogenase, dihydroloamide acetyltransferase	Metabolismo energético
PP0554	<i>acoB</i>	4,82	acetoin dehydrogenase, beta subunit	Metabolismo energético
PP0555	<i>acoA</i>	4,87	acetoin dehydrogenase, alpha subunit	Metabolismo energético
PP0556		2,57	acetoin catabolism protein	Metabolismo energético
PP0557	<i>acoR</i>	2,44	acetoin catabolism regulatory protein	Funciones reguladoras
PP0668		2,51	transmembrane sensor, putative	Funciones reguladoras
PP0807		-2,46	sigma-54 dependent transcriptional regulator	Funciones reguladoras
PP0860		1,95	sulfite reductase, flavoprotein component, putative	Metabolismo intermediario
PP0861		3,65	outer membrane ferric siderophore receptor	Proteínas de transporte y unión
PP0862		2,98	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0863		2,02	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0883		2,21	porin, putative	Proteínas de transporte y unión
PP0908		1,61	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0913		2,59	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0945		7,28	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0946	<i>sodA</i>	4,33	superoxide dismutase (Mn)	Procesos celulares
PP0999	<i>arcC</i>	-2,76	carbamate kinase	Metabolismo energético
PP1000	<i>argI</i>	-2,70	ornithine carbamoyltransferase, catabolic	Metabolismo energético
PP1001	<i>arcA</i>	-2,63	arginine deiminase	Metabolismo energético
PP1002	<i>arcD</i>	-3,26	arginine/ornithine antiporter	Proteínas de transporte y unión
PP1082	<i>bfrβ</i>	-2,19	bacterioferritin	Proteínas de transporte y unión
PP1128		-1,71	OmpA family protein	Envuelta celular
PP1130		-1,59	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP1167	<i>dctM</i>	3,00	TRAP dicarboxylate transporter, DctM subunit, putative	Proteínas de transporte y unión
PP1168	<i>dctQ</i>	2,59	TRAP dicarboxylate transporter, DctQ subunit, putative	Proteínas de transporte y unión
PP1169	<i>dctP</i>	2,74	TRAP dicarboxylate transporter, DctP subunit	Proteínas de transporte y unión
PP1173		3,19	porin, putative	Proteínas de transporte y unión
PP1317	<i>petA</i>	-2,05	ubiquinol--cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit	Metabolismo energético
PP1318	<i>petB</i>	-2,56	ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome b	Metabolismo energético
PP1319	<i>petC</i>	-1,81	ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome c1	Metabolismo energético
PP1418		2,26	tricarboxylate transport protein TctC, putative	Proteínas de transporte y unión
PP1419		2,02	porin, putative	Proteínas de transporte y unión
PP1516		1,64	RND membrane fusion protein	Procesos celulares
PP1541		1,64	methyltransferase, putative	Función desconocida
PP1543		2,24	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP1558		3,87	antitermination protein Q, putative	Elementos génicos móviles
PP1560		6,55	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP1562		2,24	phage terminase, small subunit, putative	Elementos génicos móviles

PP1563		2,20	phage terminase, large subunit, putative	Elementos génicos móviles
PP1565		1,91	phage portal protein, HK97 family	Elementos génicos móviles
PP1567		1,61	phage major capsid protein, HK97 family	Elementos génicos móviles
PP1568		2,79	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP1569		2,11	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP1573		2,37	major tail protein, putative	Elementos génicos móviles
PP1574		2,37	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP1612	<i>eno</i>	-1,60	enolase	Metabolismo energético
PP1632		2,71	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP1652		2,03	sensor histidine kinase	Funciones reguladoras
PP1690		1,73	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP1691		1,92	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP1729		-1,72	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP1829		1,75	hydrolase, alpha/beta fold family	Función desconocida
PP1833		3,60	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2010		-2,62	cytochrome b561	Metabolismo energético
PP2107		-1,69	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2108		-1,93	conserved domain protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2121		-2,19	lipoprotein, putative	Envuelta celular
PP2161		-1,82	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2187		-2,35	universal stress protein family	Procesos celulares
PP2206		-2,97	peptidase, U32 family	Procesamiento de proteínas
PP2297		1,68	integrative genetic element Ppu40, integrase	Elementos génicos móviles
PP2579		2,71	membrane protein, putative	Envuelta celular
PP2644		-1,99	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP2645	<i>mgtB</i>	-2,07	magnesium-translocating P-type ATPase	Proteínas de transporte y unión
PP2648		-2,70	universal stress protein family	Procesos celulares
PP2671		1,68	sensor histidine kinase	Funciones reguladoras
PP2683		1,61	sensory box histidine kinase/response regulator	Funciones reguladoras
PP2874		-1,72	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP2901	<i>pvdQ</i>	-1,76	penicillin amidase family protein	Procesos celulares
PP3084		1,63	outer membrane ferric siderophore receptor, putative	Proteínas de transporte y unión
PP3122		1,84	CoA-transferase, subunit A, putative	Metabolismo energético
PP3155		3,56	outer membrane ferric siderophore receptor, putative	Proteínas de transporte y unión
PP3234		-2,75	heat shock protein, HSP20 family	Procesamiento de proteínas
PP3287		-2,27	transcriptional regulator, Crp/Fnr family	Funciones reguladoras
PP3350		2,52	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP3426	<i>mexF</i>	2,13	multidrug efflux RND transporter MexF	Procesos celulares
PP3427	<i>oprN</i>	1,91	multidrug efflux RND outer membrane protein OprN	Procesos celulares
PP3468		7,22	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP3547		-1,59	oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase	Función desconocida
PP3555		-2,03	transmembrane sensor, putative	Funciones reguladoras
PP3610		-1,80	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP3612		4,24	TonB-dependent receptor, putative	Proteínas de transporte y unión
PP3621		2,11	isoquinoline 1-oxidoreductase, alpha subunit, putative	Metabolismo energético
PP3623		1,84	cytochrome c family protein	Metabolismo energético
PP3774		1,98	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3796	<i>pvdA</i>	-2,72	L-ornithine N5-oxygenase	Metabolismo intermediario
PP3798	<i>fpvH</i>	-1,66	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3799	<i>fpvJ</i>	-1,94	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3800	<i>fpvK</i>	-2,45	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3801	<i>fpvC</i>	-1,98	cation ABC transporter, periplasmic cation-binding protein	Proteínas de transporte y unión
PP3802	<i>fpvD</i>	-2,18	cation ABC transporter, ATP-binding protein, putative	Proteínas de transporte y unión
PP3803	<i>fpvE</i>	-2,12	cation ABC transporter, permease protein, putative	Proteínas de transporte y unión
PP3804	<i>fpvF</i>	-2,46	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3807		-2,54	thioesterase	Función desconocida
PP3808		-2,53	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3823		-1,61	cytochrome c-type protein	Metabolismo energético
PP3839		-1,98	alcohol dehydrogenase, zinc-containing	Metabolismo energético
PP3849		-7,51	calcium-binding protein, hemolysin-type	Elementos génicos móviles

PP3851		-7,10	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3852		-10,00	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3853		-7,60	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3857		-9,48	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3864		-7,21	phage FluMu DNA circulation protein, putative	Elementos génicos móviles
PP3865		-8,21	phage tail protein, putative	Elementos génicos móviles
PP3869		-7,68	phage sheath protein, putative	Elementos génicos móviles
PP3877		-7,60	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3879		-6,84	phage portal protein, HK97 family	Elementos génicos móviles
PP3881		-7,10	phage terminase, large subunit, putative	Elementos génicos móviles
PP3887		-7,10	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3889		-6,97	phage integrase, putative	Elementos génicos móviles
PP3893		-6,84	phage DNA helicase, putative	Elementos génicos móviles
PP3896		-10,75	transcriptional regulator, Cro/CI family	Elementos génicos móviles
PP3897		-10,01	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3898		-9,61	conserved hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3899	<i>hicB-2</i>	-8,55	hicB protein	Elementos génicos móviles
PP3900	<i>hicA-2</i>	-7,60	hicA protein	Elementos génicos móviles
PP3901		-7,42	conserved hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3904		-10,91	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3909		-11,25	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3912		-7,42	DNA-cytosine methyltransferase	Elementos génicos móviles
PP3920		-6,84	phage integrase, putative	Elementos génicos móviles
PP3929		3,34	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP4063		1,75	long-chain-fatty-acid-CoA ligase, putative	Metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos
PP4064	<i>ivd</i>	1,94	isovaleryl-CoA dehydrogenase	Metabolismo energético
PP4070		2,80	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP4103		-1,90	low-affinity inorganic phosphate transporter	Proteínas de transporte y unión
PP4208	<i>fpvI</i>	1,63	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcripción
PP4215		-1,70	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP4216	<i>pvdE</i>	-2,40	pyoverdine ABC export system, permease/ATP-binding protein	Proteínas de transporte y unión
PP4218		-3,45	lipase/esterase family protein	Función desconocida
PP4219	<i>ppsD</i>	-2,90	non-ribosomal siderophore peptide synthetase	Procesos celulares
PP4220		-3,08	non-ribosomal peptide synthetase domain protein, family 1	Función desconocida
PP4221		-1,77	non-ribosomal peptide synthetase	Síntesis de proteínas
PP4222		-2,53	syrP protein, putative	Funciones reguladoras
PP4223		-2,51	diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase	Metabolismo intermediario
PP4228		6,64	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP4243		-1,99	pyoverdine synthetase	Síntesis de proteínas
PP4250	<i>ccoN-1</i>	-2,65	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I	Metabolismo energético
PP4251	<i>ccoO-1</i>	-2,70	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II	Metabolismo energético
PP4252	<i>ccoQ-1</i>	-3,56	cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoQ subunit	Metabolismo energético
PP4253	<i>ccoP-1</i>	-3,07	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit III	Metabolismo energético
PP4264	<i>hemN</i>	-2,11	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	Biosíntesis de cofactores y grupos protéticos
PP4292		2,55	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP4421		-1,62	aminotransferase, class III	Función desconocida
PP4422		-1,68	succinate-semialdehyde dehydrogenase, putative	Metabolismo energético
PP4547		1,66	glutamine synthetase, putative	Biosíntesis de aminoácidos
PP4607		1,93	transmembrane sensor, putative	Funciones reguladoras
PP4608		1,90	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcripción
PP4609		2,59	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP4610		2,09	membrane protein, putative	Envuelta celular
PP4667	<i>mmsA-2</i>	2,25	methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	Metabolismo energético
PP4687	<i>phuV</i>	1,62	heme/hemin ABC transporter, ATP-binding protein	Proteínas de transporte y unión
PP4688	<i>phuU</i>	1,98	heme/hemin ABC transporter, permease protein	Proteínas de transporte y unión
PP4870		-2,28	azurin	Metabolismo energético
PP4894	<i>hfq</i>	-9,88	host factor-I protein	Elementos génicos móviles
PP5196		1,59	iron ABC transporter, periplasmic iron-binding protein	Proteínas de transporte y unión
PP5211		-1,74	ChaC-related protein	Función desconocida
PP5232		-1,96	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas

PP5306	<i>exbB</i>	2,96	ferric siderophore transport system protein ExbB	Proteínas de transporte y unión
PP5307	<i>exbD</i>	3,39	ferric siderophore transport system, inner membran	Proteínas de transporte y unión
PP5308	<i>tonB</i>	2,72	ferric siderophore transport system, periplasmic bin	Proteínas de transporte y unión
PP5335	<i>purK</i>	-1,64	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase	Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos
PP5389		-1,60	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas

Tabla S3 | Genes cuyos niveles de ARN son mayores o menores en el mutante doble *hfq crc* (KTHC) que en la estirpe silvestre, en MMSc y fase exponencial (0,6 A₆₀₀). Se han seleccionados los genes cuyos niveles de ARN cambian más de ± 3 veces ($\log_2FC \geq |1,585|$ y $FDR \leq 0,01$), indicando en rojo los que están más expresados y en verde los que están menos expresados.

ID	Símbolo	\log_2FC	Descripción	Función principal
PP0008	<i>rnpA</i>	1,65	ribonuclease P protein component	Transcripción
PP0091		-1,66	lipoprotein, putative	Envuelta celular
PP0161	<i>foxR</i>	3,21	transmembrane sensor, putative	Funciones reguladoras
PP0181		-2,07	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0185	<i>pprA</i>	-2,02	alginate biosynthesis protein PprA	Envuelta celular
PP0204		-2,88	transcriptional regulator, GntR family	Funciones reguladoras
PP0205		-3,15	oxidoreductase, putative	Función desconocida
PP0230	<i>tauD</i>	-2,36	alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase	Metabolismo energético
PP0232	<i>tauB</i>	-1,96	taurine ABC transporter, ATP-binding protein	Proteínas de transporte y unión
PP0233	<i>tauA</i>	-2,20	taurine ABC transporter, periplasmic taurine-binding	Proteínas de transporte y unión
PP0238	<i>ssuD</i>	-1,77	organosulfonate monooxygenase	Metabolismo intermediario
PP0239	<i>ssuC</i>	-2,19	sulfonate ABC transporter, permease protein SsuC	Proteínas de transporte y unión
PP0255		-1,68	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0267		3,31	outer membrane ferric siderophore receptor, putative	Proteínas de transporte y unión
PP0270		1,71	sensor histidine kinase	Funciones reguladoras
PP0271	<i>gltR-1</i>	2,80	DNA-binding response regulator GltR	Funciones reguladoras
PP0273		-3,78	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0351	<i>fiuR</i>	2,74	transmembrane sensor protein, putative	Función desconocida
PP0352	<i>fiuI</i>	2,13	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcripción
PP0354		-1,75	CBS domain protein	Función desconocida
PP0389	<i>rpsU</i>	2,06	ribosomal protein S21	Síntesis de proteínas
PP0395		-1,84	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0397		-2,36	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0424	<i>crp</i>	-2,31	catabolite gene activator Crp	Funciones reguladoras
PP0425		2,10	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0430		-1,59	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0433		2,03	HesB/YadR/YfhF family protein	Función desconocida
PP0481	<i>kata</i>	-1,75	catalase	Procesos celulares
PP0482	<i>bfra</i>	-3,71	bacterioferritin	Proteínas de transporte y unión
PP0490		-1,96	formate dehydrogenase, iron-sulfur subunit	Metabolismo energético
PP0504	<i>oprG</i>	-2,02	outer membrane protein OprG	Envuelta celular
PP0534		2,16	transcriptional regulator PfeR, putative	Funciones reguladoras
PP0544		2,55	ethanolamine transporter	Proteínas de transporte y unión
PP0546		-1,63	sigma-54 dependent transcriptional regulator	Funciones reguladoras
PP0552	<i>adh</i>	5,62	2,3-butanediol dehydrogenase	Metabolismo energético
PP0553	<i>acoC</i>	5,98	acetoin dehydrogenase, dihydrolipoamide acetyltransferase	Metabolismo energético
PP0554	<i>acoB</i>	5,68	acetoin dehydrogenase, beta subunit	Metabolismo energético
PP0555	<i>acoA</i>	5,66	acetoin dehydrogenase, alpha subunit	Metabolismo energético
PP0556		3,45	acetoin catabolism protein	Metabolismo energético
PP0557	<i>acoR</i>	1,91	acetoin catabolism regulatory protein	Funciones reguladoras
PP0563		-1,76	response regulator	Funciones reguladoras
PP0575		-1,61	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0585		-1,70	transcriptional regulator, MerR family	Funciones reguladoras
PP0586		-2,12	heavy metal translocating P-type ATPase	Proteínas de transporte y unión
PP0588		-2,13	copper-binding protein, putative	Proteínas de transporte y unión
PP0600	<i>rpsT</i>	1,85	ribosomal protein S20	Síntesis de proteínas
PP0625	<i>clpB</i>	-2,98	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpB	Procesamiento de proteínas
PP0667		2,77	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcripción
PP0668		3,22	transmembrane sensor, putative	Funciones reguladoras
PP0682		1,75	conserved hypothetical protein TIGR00645	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0688	<i>rplU</i>	1,75	ribosomal protein L21	Síntesis de proteínas
PP0689	<i>rpmA</i>	1,63	ribosomal protein L27	Síntesis de proteínas
PP0700		2,11	transmembrane sensor, putative	Funciones reguladoras
PP0703		2,58	transmembrane sensor, putative	Funciones reguladoras

PP0704		2,56	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcripción
PP0722	<i>prsA</i>	1,84	ribose-phosphate pyrophosphokinase	Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos
PP0723	<i>ispE</i>	1,66	4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase	Biosíntesis de cofactores y grupos protéticos
PP0788		-3,15	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0797		-2,30	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0807		-3,63	sigma-54 dependent transcriptional regulator	Funciones reguladoras
PP0832	<i>queA</i>	1,95	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isom	Síntesis de proteínas
PP0838	<i>suhB</i>	2,17	extragenic suppressor protein SuhB	Función desconocida
PP0841	<i>iscR</i>	2,36	DNA-binding transcriptional regulator IscR	Metabolismo intermediario
PP0842	<i>iscS-1</i>	1,89	cysteine desulfurase	Biosíntesis de cofactores y grupos protéticos
PP0843	<i>iscU</i>	1,68	iron-sulfur cluster assembly scaffold protein	Metabolismo intermediario
PP0848	<i>iscX</i>	1,81	cysteine desulfurase activity regulator	Metabolismo intermediario
PP0860		1,85	sulfite reductase, flavoprotein component, putative	Metabolismo intermediario
PP0861		4,85	outer membrane ferric siderophore receptor	Proteínas de transporte y unión
PP0862		4,86	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0863		3,26	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0880	<i>dppC</i>	1,77	dipeptide ABC transporter, permease protein	Proteínas de transporte y unión
PP0883		1,98	porin, putative	Proteínas de transporte y unión
PP0891		1,64	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0908		1,91	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0909		1,74	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0910		1,94	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0913		3,55	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP0933	<i>mreB</i>	2,07	rod shape-determining protein MreB	Envuelta celular
PP0999	<i>arcC</i>	-1,91	carbamate kinase	Metabolismo energético
PP1000	<i>argI</i>	-2,79	ornithine carbamoyltransferase, catabolic	Metabolismo energético
PP1001	<i>arcA</i>	-3,29	arginine deiminase	Metabolismo energético
PP1002	<i>arcD</i>	-3,58	arginine/ornithine antiporter	Proteínas de transporte y unión
PP1003		-2,55	arginine/ornithine antiporter	Proteínas de transporte y unión
PP1022	<i>zwf-1</i>	-1,93	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Metabolismo energético
PP1034	<i>cumA</i>	2,04	multicopper oxidase	Procesos celulares
PP1035	<i>cumB</i>	2,20	cumB protein	Procesos celulares
PP1082	<i>bfrβ</i>	-3,06	bacterioferritin	Proteínas de transporte y unión
PP1083		3,63	bacterioferritin-associated ferredoxin, putative	Metabolismo energético
PP1099		2,05	cold-shock domain family protein	Procesos celulares
PP1110		-4,99	serine O-acetyltransferase, putative	Biosíntesis de aminoácidos
PP1111		-4,48	synthetase, putative	Función desconocida
PP1112		-4,70	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP1113		-3,58	pyridoxal-phosphate dependent enzyme family prot	Función desconocida
PP1116		-2,91	site-specific recombinase, resolvase family	Metabolismo de ADN
PP1153		-1,94	lipoprotein, putative	Envuelta celular
PP1167	<i>dctM</i>	2,35	TRAP dicarboxylate transporter, DctM subunit, putat	Proteínas de transporte y unión
PP1168	<i>dctQ</i>	2,17	TRAP dicarboxylate transporter, DctQ subunit, putati	Proteínas de transporte y unión
PP1169	<i>dctP</i>	2,11	TRAP dicarboxylate transporter, DctP subunit	Proteínas de transporte y unión
PP1173		2,19	porin, putative	Proteínas de transporte y unión
PP1209		1,95	cold-shock domain family protein	Procesos celulares
PP1210		-2,13	DNA-binding stress protein, putative	Procesos celulares
PP1211		-1,76	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP1225		2,45	radical activating enzyme	Procesamiento de proteínas
PP1278	<i>algF</i>	-2,43	alginate O-acetyltransferase	Envuelta celular
PP1291		-3,64	PhoH family protein	Función desconocida
PP1308	<i>mdeA</i>	-2,56	methionine gamma-lyase	Metabolismo energético
PP1318	<i>petB</i>	-1,96	ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome b	Metabolismo energético
PP1319	<i>petC</i>	-1,65	ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome c1	Metabolismo energético
PP1354		1,59	multidrug efflux MFS transporter, putative	Procesos celulares
PP1400		1,77	dicarboxylate MFS transporter	Proteínas de transporte y unión
PP1443	<i>lon-1</i>	-1,63	ATP-dependent protease La	Procesamiento de proteínas
PP1527		1,59	ThiF family protein	Función desconocida
PP1651		3,73	DNA-binding response regulator	Funciones reguladoras
PP1652		2,98	sensor histidine kinase	Funciones reguladoras

PP1690		1,83	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP1691		3,21	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP1741		1,65	glycine betaine-binding protein, putative	Proteínas de transporte y unión
PP1742		-1,62	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP1823	<i>folE-1</i>	1,60	GTP cyclohydrolase I	Biosíntesis de cofactores y grupos protéticos
PP1910		1,65	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP1912	<i>plsX</i>	1,68	fatty acid/phospholipid synthesis protein PlsX	Metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos
PP2010		-2,52	cytochrome b561	Metabolismo energético
PP2055		2,44	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2107		-1,81	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2121		-2,13	lipoprotein, putative	Envuelta celular
PP2161		-2,33	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2187		-2,75	universal stress protein family	Procesos celulares
PP2192	<i>iutY</i>	2,50	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily/trar	Funciones reguladoras
PP2193	<i>iutA</i>	2,16	outer membrane ferric siderophore receptor	Proteínas de transporte y unión
PP2251		-2,46	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2256		2,42	transcriptional regulator, Cro/Ci family	Funciones reguladoras
PP2257	<i>aer-1</i>	-4,09	aerotaxis receptor Aer-1	Procesos celulares
PP2258		-3,18	sensory box protein	Funciones reguladoras
PP2357		-1,98	type 1 pili protein CsuB, putative	Envuelta celular
PP2462		1,65	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2487		-1,77	aldehyde dehydrogenase family protein	Metabolismo energético
PP2634		2,46	cellulose synthase, putative	Envuelta celular
PP2644		-3,92	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP2645	<i>mgtB</i>	-5,08	magnesium-translocating P-type ATPase	Proteínas de transporte y unión
PP2646		-4,96	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP2648		-2,75	universal stress protein family	Procesos celulares
PP2674	<i>qedH</i>	3,74	quinoprotein ethanol dehydrogenase	Metabolismo energético
PP2771		-1,79	sigma-54 dependent transcriptional regulator	Funciones reguladoras
PP2772		-1,71	monooxygenase, putative	Función desconocida
PP2877		2,13	transporter, bile acid/Na+ symporter family	Proteínas de transporte y unión
PP2946		-1,62	peptidyl-tRNA hydrolase domain protein	Función desconocida
PP3039		2,04	pyocin R2_PP, conserved hypothetical protein	Procesos celulares
PP3081		-1,76	conserved hypothetical protein TIGR00481	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3082		2,26	membrane protein, putative	Envuelta celular
PP3084		2,18	outer membrane ferric siderophore receptor, putative	Proteínas de transporte y unión
PP3085		2,86	transmembrane sensor, putative	Funciones reguladoras
PP3086		2,51	RNA polymerase sigma-70 factor, putative	Transcripción
PP3128		-1,67	exopolysaccharide biosynthesis/transport protein, p	Envuelta celular
PP3155		4,59	outer membrane ferric siderophore receptor, putative	Proteínas de transporte y unión
PP3234		-1,85	heat shock protein, HSP20 family	Procesamiento de proteínas
PP3235		-2,97	conserved domain protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3287		-2,20	transcriptional regulator, Crp/Fnr family	Funciones reguladoras
PP3385		-2,19	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3386	<i>vgrG-2</i>	-2,28	vgrG protein	Función desconocida
PP3443		-2,01	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, putative	Metabolismo energético
PP3453		1,69	sensor protein RstB, putative	Transducción de señales
PP3454		1,67	transcriptional regulatory protein RstA, putative	Funciones reguladoras
PP3455		2,60	multidrug efflux RND membrane fusion protein	Procesos celulares
PP3456		2,07	multidrug efflux RND transporter	Procesos celulares
PP3468		6,44	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP3529		-2,04	monooxygenase, putative	Función desconocida
PP3550		2,44	transcriptional regulator EmrR, putative	Procesos celulares
PP3576		2,09	transmembrane sensor, putative	Funciones reguladoras
PP3581		2,10	GGDEF domain protein	Función desconocida
PP3607		1,92	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3608		-1,86	transcriptional regulator, LysR family	Funciones reguladoras
PP3610		-1,59	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP3612		3,75	TonB-dependent receptor, putative	Proteínas de transporte y unión
PP3629		-2,35	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas

PP3781		-2,95	oxygen-independent Coproporphyrinogen III oxidase	Procesos celulares
PP3782		-2,28	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP3783		-3,50	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3784		-3,46	conserved domain protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3785		-3,02	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP3786		-2,63	aminotransferase	Procesos celulares
PP3787		-1,70	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP3788		-1,72	non-ribosomal peptide synthetase, putative	Procesos celulares
PP3796	<i>pvdA</i>	-3,36	L-ornithine N5-oxygenase	Metabolismo intermediario
PP3797	<i>fpvG</i>	-2,01	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3798	<i>fpvH</i>	-3,09	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3799	<i>fpvJ</i>	-3,40	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3800	<i>fpvK</i>	-2,91	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3801	<i>fpvC</i>	-3,48	cation ABC transporter, periplasmic cation-binding p	Proteínas de transporte y unión
PP3802	<i>fpvD</i>	-2,63	cation ABC transporter, ATP-binding protein, putativ	Proteínas de transporte y unión
PP3803	<i>fpvE</i>	-2,49	cation ABC transporter, permease protein, putative	Proteínas de transporte y unión
PP3804	<i>fpvF</i>	-3,04	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3807		-3,37	thioesterase	Función desconocida
PP3808		-2,73	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP3822		-1,82	cytochrome c family protein	Metabolismo energético
PP3823		-1,90	cytochrome c-type protein	Metabolismo energético
PP3839		-2,30	alcohol dehydrogenase, zinc-containing	Metabolismo energético
PP3840		-1,71	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP3849		-7,35	calcium-binding protein, hemolysin-type	Proteínas de transporte y unión
PP3851		-6,94	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3852		-9,84	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3853		-7,44	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3857		-9,32	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3864		-7,05	phage FluMu DNA circulation protein, putative	Elementos génicos móviles
PP3865		-8,05	phage tail protein, putative	Elementos génicos móviles
PP3869		-7,52	phage sheath protein, putative	Elementos génicos móviles
PP3877		-7,44	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3879		-6,68	phage portal protein, HK97 family	Elementos génicos móviles
PP3881		-6,94	phage terminase, large subunit, putative	Elementos génicos móviles
PP3887		-6,94	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3889		-6,82	phage integrase, putative	Elementos génicos móviles
PP3893		-6,68	phage DNA helicase, putative	Elementos génicos móviles
PP3896		-10,59	transcriptional regulator, Cro/Ci family	Elementos génicos móviles
PP3897		-9,85	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3898		-9,45	conserved hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3899	<i>hicB-2</i>	-8,39	hicB protein	Elementos génicos móviles
PP3900	<i>hicA-2</i>	-7,44	hicA protein	Elementos génicos móviles
PP3901		-7,26	conserved hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3904		-10,75	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3909		-11,09	hypothetical protein	Elementos génicos móviles
PP3912		-7,26	DNA-cytosine methyltransferase	Elementos génicos móviles
PP3920		-6,68	phage integrase, putative	Elementos génicos móviles
PP3931		-2,09	transporter, sodium/sulfate symporter family	Proteínas de transporte y unión
PP4007	<i>infA</i>	2,03	translation initiation factor IF-1	Síntesis de proteínas
PP4070		4,92	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP4102		-1,72	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP4103		-1,84	low-affinity inorganic phosphate transporter	Proteínas de transporte y unión
PP4115		-2,36	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP4208	<i>fpvI</i>	2,52	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcripción
PP4211	<i>ompQ</i>	-1,68	ABC export system, outer membrane protein	Proteínas de transporte y unión
PP4212	<i>pvdP</i>	-2,30	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP4213	<i>pvdM</i>	-1,69	dipeptidase, putative	Procesamiento de proteínas
PP4214	<i>pvdN</i>	-2,95	aminotransferase, class V	Función desconocida
PP4215	<i>pvdO</i>	-2,75	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP4216	<i>pvdE</i>	-3,98	pyoverdine ABC export system, permease/ATP-bindi	Proteínas de transporte y unión

PP4217	<i>fpvA</i>	-2,71	outer membrane ferripyoverdine receptor	Proteínas de transporte y unión
PP4218		-3,96	lipase/esterase family protein	Función desconocida
PP4219	<i>pvdD</i>	-3,88	non-ribosomal siderophore peptide synthetase	Procesos celulares
PP4220	<i>pvdJ</i>	-4,36	non-ribosomal peptide synthetase domain protein, γ	Función desconocida
PP4221	<i>pvdI</i>	-3,14	non-ribosomal peptide synthetase	Síntesis de proteínas
PP4222	<i>syrP</i>	-3,66	syrP protein, putative	Funciones reguladoras
PP4223	<i>pvdH</i>	-3,76	diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase	Metabolismo intermediario
PP4243	<i>pvdL</i>	-3,36	pyoverdine synthetase	Síntesis de proteínas
PP4244	<i>pfrI (pvdS)</i>	2,21	ferric regulator PfrI	Funciones reguladoras
PP4245	<i>pvdY</i>	-2,11	siderophore biosynthesis protein, putative	Proteínas de transporte y unión
PP4250	<i>ccoN-1</i>	-2,20	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I	Metabolismo energético
PP4251	<i>ccoO-1</i>	-2,92	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II	Metabolismo energético
PP4252	<i>ccoQ-1</i>	-3,16	cytochrome c oxidase, cbb3-type, CcoQ subunit	Metabolismo energético
PP4253	<i>ccoP-1</i>	-3,33	cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit III	Metabolismo energético
PP4259		-1,64	iron-sulfur cluster-binding protein	Metabolismo energético
PP4260		-1,98	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP4264	<i>hemN</i>	-1,85	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	Biosíntesis de cofactores y grupos protéticos
PP4278	<i>xdhA</i>	-2,61	xanthine dehydrogenase, XdhA subunit	Metabolismo energético
PP4292		3,51	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP4364		-1,99	anti-sigma F factor antagonist, putative	Funciones reguladoras
PP4394	<i>flgA</i>	-1,74	flagella basal body P-ring formation protein FlgA	Procesos celulares
PP4397		2,17	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP4421		-1,96	aminotransferase, class III	Función desconocida
PP4422		-2,20	succinate-semialdehyde dehydrogenase, putative	Metabolismo energético
PP4428		-2,54	amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-	Proteínas de transporte y unión
PP4483		1,72	basic amino acid ABC transporter, ATP-binding prote	Proteínas de transporte y unión
PP4561		1,74	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP4597	<i>moaA</i>	-1,80	molybdenum cofactor biosynthesis protein A	Biosíntesis de cofactores y grupos protéticos
PP4607		1,89	transmembrane sensor, putative	Funciones reguladoras
PP4608		2,44	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcripción
PP4609		2,44	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP4610		3,08	membrane protein, putative	Envuelta celular
PP4611	<i>fecR</i>	2,46	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	Transcripción
PP4612		1,86	FecR protein, putative	Funciones reguladoras
PP4667	<i>mmsA-2</i>	1,63	methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	Metabolismo energético
PP4687	<i>phuV</i>	1,60	heme/hemin ABC transporter, ATP-binding protein	Proteínas de transporte y unión
PP4688	<i>phuU</i>	2,13	heme/hemin ABC transporter, permease protein	Proteínas de transporte y unión
PP4736	<i>lldD</i>	-1,63	L-lactate dehydrogenase	Metabolismo energético
PP4753		-2,49	N-methylproline demethylase, putative	Metabolismo energético
PP4754		-1,72	transcriptional regulator, TetR family	Funciones reguladoras
PP4817		-2,35	MaoC domain protein	Función desconocida
PP4894	<i>hfq</i>	-12,57	host factor-I protein	Elementos génicos móviles
PP5003	<i>phaA</i>	-1,91	poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase 1	Metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos
PP5008		-1,61	polyhydroxyalkanoate granule-associated protein GA	Metabolismo intermediario
PP5036		-1,88	chlorohydrolase family protein	Función desconocida
PP5196		2,72	iron ABC transporter, periplasmic iron-binding protei	Proteínas de transporte y unión
PP5207		-2,29	ABC transporter, ATP-binding protein/permease pro	Proteínas de transporte y unión
PP5211		-1,90	ChaC-related protein	Función desconocida
PP5261		-1,94	transcriptional regulator, LysR family	Funciones reguladoras
PP5291	<i>pyrE</i>	2,90	orotate phosphoribosyltransferase	Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos
PP5292	<i>crc</i>	-4,20	catabolite repression control protein	Funciones reguladoras
PP5295		1,64	conserved hypothetical protein TIGR00255	Proteínas hipotéticas conservadas
PP5298		1,93	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas
PP5306	<i>exbB</i>	3,96	ferric siderophore transport system protein ExbB	Proteínas de transporte y unión
PP5307	<i>exbD</i>	4,34	ferric siderophore transport system, inner membran	Proteínas de transporte y unión
PP5308	<i>tonB</i>	3,58	ferric siderophore transport system, periplasmic bin	Proteínas de transporte y unión
PP5313	<i>hupA</i>	2,19	DNA-binding protein HU-alpha	Metabolismo de ADN
PP5346	<i>oadA</i>	-1,82	oxaloacetate decarboxylase, alpha subunit	Metabolismo energético
PP5347	<i>accC-2</i>	-1,96	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase	Metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos
PP5358		-1,81	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas

PP5382		-3,47	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP5383	<i>copR</i>	-2,50	transcriptional activator CopR	Funciones reguladoras
PP5384	<i>copS</i>	-2,17	sensor protein CopS	Transducción de señales
PP5389		-3,28	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP5390		-2,63	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP5391		-3,06	hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
PP5393		-1,67	conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas conservadas

Tabla S4 | Proteínas cuya abundancia es mayor (indicadas en rojo) o menor (indicadas en verde) en los mutantes *crc* (KTVC), *hfq* (KT2440Δ*hfq*) y *hfq crc* (KTHC) respecto a la estirpe silvestre KT2440, en MMScc a 0,6 A₆₀₀. Se muestran todas las proteínas detectadas cuya abundancia cambia en al menos uno de los mutantes (*q*-valor ≤ 0,05, indicado en amarillo; y log₂FC ≥ |0,49|). Las proteínas no detectadas se señalan con "nd". También se indica cuáles de estos genes presentan un motivo CA cerca de su inicio de traducción.

ID	Símbolo	<i>crc</i> _log ₂ FC	<i>crc</i> _q-valor	<i>hfq</i> _log ₂ FC	<i>hfq</i> _q-valor	<i>hfq crc</i> _log ₂ FC	<i>hfq crc</i> _q-valor	motivo CA	TIGR Common Name
PP0005	<i>trmE</i>	-0,43	0,44	-0,19	0,83	-0,79	0,02	motivo CA	tRNA modification GTPase
PP0126		0,06	0,96	-0,34	0,28	-0,50	0,04		cytochrome c4
PP0160		0,29	0,80	0,69	0,12	1,10	0,02		ferrioxamine receptor, Ton-B dependent transducer
PP0168		-0,63	0,02	-0,46	0,01	-0,11	0,57		surface adhesion protein, putative
PP0241	<i>ssuF</i>	0,80	0,02	0,15	0,77	-0,84	0,01	motivo CA	organosulfonate utilization protein SsuF
PP0258		0,11	0,89	-0,43	0,10	-1,03	0,01		LysM domain protein
PP0383		0,23	0,66	-0,01	0,92	0,49	0,03		tryptophan 2-monooxygenase, putative
PP0397		0,11	0,84	-0,39	0,04	-0,61	0,01		conserved hypothetical protein
PP0440	<i>tuf-1</i>	-0,12	0,80	-0,08	0,90	-0,49	0,01		translation elongation factor Tu
PP0449	<i>rpsL</i>	0,39	0,44	1,70	0,01	0,67	0,03		ribosomal protein S12
PP0450	<i>rpsG</i>	0,16	0,80	0,80	0,02	0,56	0,02		ribosomal protein S7
PP0454	<i>rplC</i>	-0,52	0,04	0,16	0,55	0,06	0,70		ribosomal protein L3
PP0457	<i>rplB</i>	0,00	0,95	0,80	0,01	0,20	0,37		ribosomal protein L2
PP0458	<i>rpsS</i>	-0,13	0,86	0,59	0,03	0,21	0,39	motivo CA	ribosomal protein S19
PP0460	<i>rpsC</i>	0,09	0,92	1,48	0,01	0,82	0,01		ribosomal protein S3
PP0461	<i>rplP</i>	-0,09	0,94	0,57	0,06	0,57	0,05		ribosomal protein L16
PP0467	<i>rpsN</i>	-0,07	0,96	0,67	0,04	0,46	0,10		ribosomal protein S14
PP0469	<i>rplF</i>	-0,67	0,03	-0,16	0,61	-0,06	0,71		ribosomal protein L6
PP0471	<i>rpsE</i>	-0,50	0,02	-0,07	0,89	0,05	0,72		ribosomal protein S5
PP0480	<i>rplQ</i>	-0,04	0,96	0,60	0,01	0,57	0,01		ribosomal protein L17
PP0517	<i>ribH</i>	0,82	0,05	1,18	0,01	0,40	0,03		riboflavin synthase, beta subunit
PP0553	<i>acoC</i>	-0,62	0,26	0,68	0,03	0,62	0,02		acetoin dehydrogenase, dihydrolipoamide acetyltransferase component
PP0554	<i>acoB</i>	-0,25	0,50	0,43	0,04	0,88	0,01		acetoin dehydrogenase, beta subunit
PP0555	<i>acoA</i>	0,02	0,95	0,83	0,02	1,23	0,01		acetoin dehydrogenase, alpha subunit
PP0688	<i>rplU</i>	-0,25	0,37	1,04	0,01	0,67	0,01		50S ribosomal protein L21
PP0690	<i>obgE</i>	0,04	0,96	0,21	0,32	0,50	0,01		GTP-binding protein, GTP1/Obg family
PP0763		0,06	0,96	-0,33	0,72	-1,12	0,02		medium-chain-fatty-acid CoA ligase
PP0882	<i>dppA</i>	0,36	0,48	0,62	0,03	0,65	0,02		dipeptide ABC transporter, periplasmic dipeptide-binding protein
PP0883		-0,28	0,62	1,03	0,01	0,16	0,62		porin, putative
PP0884		0,23	0,78	0,68	0,04	0,99	0,01		dipeptide ABC transporter, periplasmic peptide-binding protein

PP0885		0,24	0,64	0,80	0,01	1,00	0,01		dipeptide ABC transporter, periplasmic peptide-binding protein
PP0913		-0,37	0,46	0,13	0,90	0,51	0,05		conserved hypothetical protein
PP0915	<i>sodB</i>	-0,18	0,74	-0,09	0,91	-0,64	0,02		superoxide dismutase (Fe)
PP0985		0,00	0,95	0,27	0,29	0,59	0,01		cold-shock domain family protein
PP0999	<i>arcC</i>	0,08	0,93	-0,42	0,05	-0,71	0,01		carbamate kinase
PP1000	<i>argI</i>	0,19	0,53	-0,44	0,01	-1,12	0,00		ornithine carbamoyltransferase, catabolic
PP1001	<i>arcA</i>	0,25	0,22	-0,38	0,01	-0,93	0,01		arginine deiminase
PP1009	<i>gap-1</i>	0,25	0,48	0,60	0,01	0,23	0,25	motivo CA	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
PP1071	<i>aatJ</i>	0,19	0,48	0,50	0,01	0,60	0,00	motivo CA	amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein
PP1084		0,21	0,44	-0,11	0,78	-0,57	0,01		antioxidant, AhpC/Tsa family
PP1111		-0,04	0,96	0,10	0,89	-0,75	0,01		synthetase, putative
PP1141	<i>braC</i>	0,09	0,85	0,63	0,02	0,63	0,00		branched-chain amino acid ABC transporter, periplasmic
PP1210		-0,01	0,95	-0,33	0,26	-0,54	0,03		DNA-binding stress protein, putative
PP1245		-0,02	0,96	-0,10	0,91	-0,53	0,05		hypothetical protein
PP1315	<i>rplM</i>	-0,70	0,03	0,04	0,92	0,03	0,79		ribosomal protein L13
PP1316	<i>rpsI</i>	-0,21	0,67	0,75	0,01	0,61	0,01		ribosomal protein S9
PP1522	<i>cspA-1</i>	0,42	0,10	0,44	0,03	0,53	0,01	motivo CA	cold shock protein CspA
PP1602	<i>fabZ</i>	0,12	0,89	0,14	0,88	0,63	0,02		(3R)-hydroxymyristoyl-(acyl-carrier-protein) dehydratase
PP1625	<i>fdxA</i>	-0,09	0,96	-0,09	0,92	0,82	0,03		ferredoxin, 4Fe-4S
PP1726		-0,17	0,91	-0,45	0,49	-0,88	0,04		ABC transporter, periplasmic binding protein
PP1859	<i>ohr</i>	-0,02	0,96	0,51	0,01	0,24	0,15		organic hydroperoxide resistance protein
PP2089	<i>oprF</i>	0,11	0,88	0,88	0,01	0,45	0,03		outer membrane protein OprF
PP2128	<i>chev-2</i>	0,30	0,81	0,11	0,92	0,85	0,05		chemotaxis protein CheV
PP2213	<i>fadDx</i>	0,10	0,90	0,59	0,02	0,25	0,30		acyl-CoA ligase
PP2294		0,39	0,86	0,09	0,93	1,34	0,05		hypothetical protein
PP2322	<i>oprl</i>	0,29	0,44	1,09	0,01	0,26	0,21		outer membrane lipoprotein Oprl
PP2439	<i>ahpC</i>	-0,03	0,96	0,15	0,70	0,57	0,01		alkyl hydroperoxide reductase, C subunit
PP2454	<i>rbsB</i>	0,29	0,48	0,60	0,02	0,55	0,01		ribose ABC transporter, periplasmic ribose-binding protein
PP2468	<i>rplT</i>	0,03	0,96	0,64	0,03	0,48	0,06		ribosomal protein L20
PP2550		0,01	0,95	0,20	0,69	0,51	0,03		conserved hypothetical protein TIGR01033
PP2652		-0,01	0,95	-0,53	0,39	-0,93	0,04		hydratase/decarboxylase, putative
PP2934		-0,60	0,44	0,06	0,93	-1,46	0,03		hypothetical protein
PP3089		0,15	0,75	-0,15	0,70	-0,85	0,01		conserved hypothetical protein
PP3122		0,45	0,07	0,65	0,02	0,46	0,02		CoA-transferase, subunit A, putative
PP3123		0,78	0,07	1,09	0,02	0,74	0,02	motivo CA	CoA-transferase, subunit B, putative
PP3433	<i>hpd</i>	0,16	0,62	0,64	0,01	-0,64	0,01		4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase

PP3443		-0,22	0,87	-0,33	0,71	-0,80	0,05		glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, putative
PP3591		0,32	0,26	0,11	0,87	0,58	0,01		malate dehydrogenase, putative
PP3593		0,20	0,70	0,25	0,46	0,50	0,02	motivo CA	amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein
PP3668	<i>katB</i>	0,29	0,48	0,04	0,93	-0,54	0,05		catalase/peroxidase HPI
PP3680		0,48	0,53	0,97	0,04	0,79	0,05		hypothetical protein
PP3784		-0,56	0,25	0,16	0,87	-0,57	0,05		conserved domain protein
PP3796	<i>pvdA</i>	0,02	0,96	-0,75	0,03	-0,68	0,03		L-ornithine N5-oxygenase
PP3839		-0,04	0,96	-0,38	0,02	-1,00	0,01		alcohol dehydrogenase, zinc-containing
PP3904		-0,08	0,96	-1,83	0,01	-1,68	0,01		hypothetical protein
PP4011	<i>icd</i>	0,05	0,95	-0,67	0,01	-1,15	0,01		isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent, prokaryotic-type
PP4034		0,44	0,04	0,62	0,01	-0,36	0,04	CA motif	N-carbamoyl-beta-alanine amidohydrolase, putative
PP4037		0,43	0,18	0,59	0,03	-0,08	0,73		glutamate synthase, small subunit, putative
PP4064	<i>ivd</i>	0,16	0,70	0,35	0,05	0,57	0,01		isovaleryl-CoA dehydrogenase
PP4116	<i>aceA</i>	0,54	0,03	-0,76	0,01	-0,87	0,01		isocitrate lyase
PP4124	<i>nuoG</i>	-0,52	0,04	0,01	0,92	0,04	0,75		NADH dehydrogenase I, G subunit
PP4192	<i>sdhD</i>	-0,20	0,85	0,83	0,04	1,34	0,01		succinate dehydrogenase, hydrophobic membrane anchor protein
PP4217	<i>fpvA</i>	-0,05	0,95	-0,766	0,01	-0,68	0,01		siderophores)
PP4223	<i>pvdH</i>	0,23	0,49	-0,39	0,04	-0,58	0,01		diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase
PP4243	<i>pvdL</i>	0,81	0,52	-1,04	0,03	nd	nd		pyoverdine synthetase
PP4248		-0,10	0,88	-0,41	0,04	-0,57	0,01		conserved hypothetical protein
PP4340	<i>cheY</i>	-0,06	0,95	0,09	0,89	0,56	0,02		chemotaxis protein CheY
PP4376	<i>fliD</i>	-0,56	0,18	-0,66	0,04	-0,68	0,03		flagellar cap protein FlID
PP4401	<i>bkdA1</i>	0,32	0,18	0,75	0,01	0,71	0,01	CA motif	2-oxoisovalerate dehydrogenase, alpha subunit
PP4402	<i>bkdA2</i>	0,01	0,95	0,50	0,04	0,58	0,02		2-oxoisovalerate dehydrogenase, beta subunit
PP4403	<i>bkdB</i>	0,14	0,73	0,67	0,01	0,36	0,02		2-oxoisovalerate dehydrogenase, lipoamide acyltransferase component
PP4404	<i>lpdV</i>	0,12	0,80	0,63	0,01	0,43	0,01		2-oxoisovalerate dehydrogenase, lipoamide dehydrogenase component
PP4448		-0,05	0,95	-0,28	0,19	-0,58	0,01		conserved hypothetical protein
PP4480	<i>aruF</i>	-0,70	0,25	-0,53	0,34	-0,80	0,05		arginine N-succinyltransferase, alpha subunit
PP4487	<i>acsA</i>	0,37	0,03	0,74	0,01	0,54	0,01	motivo CA	acetyl-coA synthetase
PP4519	<i>tolC</i>	0,06	0,92	-0,10	0,77	-0,54	0,00		agglutination protein
PP4621	<i>hmgA</i>	0,19	0,73	0,52	0,03	0,24	0,29	motivo CA	homogentisate 1,2-dioxygenase
PP4636		0,33	0,18	0,77	0,01	0,28	0,10	motivo CA	beta-ketothiolase
PP4667	<i>mmsA-2</i>	0,48	0,02	0,49	0,01	-0,01	0,83		methylmalonate semialdehyde dehydrogenase
PP4870		0,20	0,56	-0,16	0,69	-0,52	0,01		azurin
PP4876	<i>rpsR</i>	0,15	0,80	0,65	0,02	0,59	0,01		ribosomal protein S18
PP4893	<i>hflX</i>	0,03	0,96	0,50	0,02	0,30	0,13		GTP-binding protein HflX

PP5070		0,15	0,90	-0,75	0,04	-0,56	0,07		ParA family protein
PP5136		-2,19	0,03	-1,81	0,01	-1,06	0,02		ABC transporter, permease protein
PP5155	<i>serA</i>	0,02	0,96	0,01	0,92	-0,49	0,01		D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
PP5172		0,22	0,78	-0,03	0,93	-0,97	0,02		conserved hypothetical protein
PP5181	<i>potF-2</i>	0,06	0,93	-0,02	0,92	-0,51	0,01	motivo CA	putrescine ABC transporter, periplasmic putrescine-binding protein
PP5282	<i>rpmB</i>	-0,14	0,86	0,51	0,05	0,32	0,16		ribosomal protein L28
PP5292	<i>crc</i>	-0,50	0,26	-0,06	0,92	-0,56	0,05		catabolite repression control protein
PP5313	<i>hupA</i>	0,22	0,85	1,03	0,03	1,08	0,02	motivo CA	DNA-binding protein HU-alpha
PP5417	<i>atpF</i>	0,30	0,22	0,74	0,01	0,26	0,13		ATP synthase F0, B subunit

Tabla S5 | Efecto de la inactivación de *hfq* y/o *crc* sobre el nivel de los ARN (medido por RNA-Seq) y de proteína (medido por iTRAQ) de los genes relacionados con la homeostasis del hierro. Se indican los valores de log₂FC obtenidos en los correspondientes ensayos de transcriptómica y de proteómica, en los que se compara la estirpe silvestre KT2240 con los mutantes *crc* (KTVC), *hfq* (KT2440Δ*hfq*) y *hfq crc* (KTHC), en medio MMScc a 0,6 A₆₀₀. Se ha interpretado como cambio aquellos genes cuyo nivel de ARN cambia más de ± 3 veces (log₂FC ≥ |1,585|; FDR ≤ 0,01), y cuyo nivel de proteína cambia más de ± 1,4 veces (log₂FC ≥ |0,49|; *q*-valor ≤ 0,05). Rojo, mayor expresión en el mutante; verde menor expresión en el mutante; "sc", sin cambio; "nd" no detectado.

ID	Símbolo	<i>crc</i> (RNA-Seq)	<i>hfq</i> (RNA-Seq)	<i>hfq crc</i> (RNA-Seq)	<i>crc</i> (iTRAQ)	<i>hfq</i> (iTRAQ)	<i>hfq crc</i> (iTRAQ)	Descripción
PP_0160	<i>foxA</i>	sc	sc	sc	sc	sc	1,10	ferrioxamine receptor, Ton-B dependent transducer
PP_0161	<i>foxR</i>	sc	2,55	3,21	nd	nd	nd	FecR-type anti-sigma factor
PP_0162	<i>foxI</i> (<i>ECFσ-8</i>)	sc	sc	sc	nd	nd	nd	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
PP_0206		sc	sc	sc	nd	nd	nd	ferredoxin, 4Fe-4S
PP_0267		sc	2,91	3,31	nd	nd	nd	outer membrane ferric siderophore receptor, putative
PP_0272		-2,08	sc	sc	nd	nd	nd	outer membrane ferric siderophore receptor
PP_0297	<i>sda-1</i>	sc	sc	sc	nd	nd	nd	L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, single chain form
PP_0311		sc	sc	sc	sc	sc	sc	iron-sulfur cluster-binding protein
PP_0350	<i>fiuA</i>	sc	sc	sc	nd	nd	nd	ferrichrome-iron receptor
PP_0351	<i>fiuR</i>	sc	2,34	2,74	nd	nd	nd	transmembrane sensor
PP_0352	<i>fiuI</i> (<i>ECFσ-7</i>)	sc	sc	2,13	nd	nd	nd	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
PP_0482	<i>bfrA</i>	-1,23	-3,40	-3,71	nd	nd	nd	bacterioferritin
PP_0535		sc	sc	sc	nd	nd	nd	outer membrane ferric siderophore receptor
PP_0667	<i>ECFσ-15</i>	sc	sc	2,77	nd	nd	nd	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
PP_0668		sc	2,51	3,22	nd	nd	nd	transmembrane sensor, anti-sigma factor
PP_0669		sc	1,51	1,47	nd	nd	nd	outer membrane ferric siderophore receptor, TonB-dependent transducer
PP_0700		sc	sc	2,11	nd	nd	nd	transmembrane sensor, anti-sigma factor
PP_0703		sc	sc	2,58	nd	nd	nd	transmembrane sensor, anti-sigma factor
PP_0704	<i>ECFσ-16</i>	sc	sc	2,56	nd	nd	nd	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
PP_0744	<i>hemH</i>	sc	sc	sc	sc	sc	sc	ferrochelataase
PP_0841	<i>iscR</i>	sc	1,57	2,36	sc	sc	sc	DNA-binding transcriptional regulator IscR
PP_0842	<i>iscS-I</i>	sc	sc	1,89	sc	sc	sc	cysteine desulfurase
PP_0843	<i>iscU</i>	sc	1,1	1,68	sc	sc	sc	iron-binding protein IscU
PP_0844	<i>iscA</i>	sc	sc	1,56	sc	sc	sc	iron-binding protein IscA
PP_0847		sc	sc	1,35	nd	nd	nd	ferredoxin, 2Fe-2S
PP_0861		sc	3,65	4,85	sc	sc	sc	outer membrane ferric siderophore receptor
PP_0865		sc	sc	sc	nd	nd	nd	ECF sigma factor
PP_0866		sc	sc	sc	nd	nd	nd	transmembrane sensor
PP_0867		sc	sc	sc	nd	nd	nd	FecA-like outer membrane receptor
PP_0899		sc	sc	sc	nd	nd	nd	ferredoxin reductase, putative
PP_0994	<i>ECFσ-13</i>	sc	sc	sc	nd	nd	nd	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
PP_1005	<i>hemO</i>	sc	sc	sc	nd	nd	nd	heme oxygenase
PP_1006		sc	sc	sc	sc	sc	sc	TonB-dependent transducer, putative heme receptor

PP_1007		sc	sc	sc	nd	nd	nd	FecR-type anti-sigma factor
PP_1008	ECF α -14	sc	sc	sc	nd	nd	nd	RNA polymerase sigma-70 factor, putative PvdS
PP_1056		sc	sc	sc	sc	sc	sc	iron-chelator utilization protein, putative
PP_1060		sc	-1,17	-1,43	nd	nd	nd	ferrioxamine recepto putative, TonB-dependent transducer
PP_1082	<i>bfr</i> β	sc	-2,19	-3,06	sc	sc	sc	bacterioferritin
PP_1083		sc	sc	3,63	nd	nd	nd	bacterioferritin-associated ferredoxin, putative
PP_1317	<i>petA</i>	sc	-2,05	-1,29	sc	sc	sc	ubiquinol--cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit
PP_1625		sc	-1,08	sc	sc	sc	0,82	ferredoxin, 4Fe-4S
PP_1638	<i>fpr</i>	sc	-1,01	sc	sc	sc	sc	ferredoxin--NADP reductase
PP_2192	<i>iutY</i>	sc	sc	2,50	nd	nd	nd	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily; hybrid protein anti-sigma factor and sigma-factor
PP_2193	<i>iutA</i>	sc	1,44	2,16	nd	nd	nd	outer membrane ferric siderophore receptor, TonB-dependent transducer
PP_2242	<i>fepA</i>	sc	sc	sc	nd	nd	nd	outer membrane ferric enterobactin receptor
PP_2416		sc	sc	sc	nd	nd	nd	iron ABC transporter, ATP-binding protein, putative
PP_2417		sc	sc	sc	nd	nd	nd	iron ABC transporter, permease protein, putative
PP_2418		sc	sc	sc	nd	nd	nd	iron ABC transporter, periplasmic iron-binding protein, putative
PP_2420		sc	sc	sc	nd	nd	nd	outer membrane ferric siderophore receptor
PP_2582		sc	sc	sc	nd	nd	nd	heme oxygenase, putative
PP_2590		sc	sc	sc	nd	nd	nd	outer membrane ferric siderophore receptor
PP_2591		sc	sc	sc	nd	nd	nd	ferric siderophore ABC transporter, periplasmic siderophore-binding protein
PP_2592		sc	sc	sc	nd	nd	nd	ferric siderophore ABC transporter, ATP-binding protein
PP_2593		sc	sc	sc	nd	nd	nd	ferric siderophore ABC transporter, permease protein
PP_2594		sc	sc	sc	nd	nd	nd	ferric siderophore ABC transporter, permease protein
PP_2641		sc	sc	sc	nd	nd	nd	iron-sulfur cluster-binding protein
PP_2888	ECF α -11	sc	sc	sc	nd	nd	nd	ECF sigma factor PrtI, putative
PP_2901	<i>pvdQ</i>	-1,93	-1,76	-1,38	nd	nd	nd	acyl-homoserine lactone acylase PvdQ
PP_3006	ECF α -12	sc	sc	sc	nd	nd	nd	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
PP_3084		sc	1,63	2,18	nd	nd	nd	outer membrane ferric siderophore receptor, TonB-dependent transducer
PP_3085		sc	sc	2,86	nd	nd	nd	transmembrane sensor
PP_3086		sc	sc	2,51	nd	nd	nd	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF factor
PP_3155		sc	3,56	4,59	sc	sc	sc	outer membrane ferric siderophore receptor, putative
PP_3163	<i>benC</i>	sc	sc	sc	nd	nd	nd	benzoate dioxygenase, ferredoxin reductase component
PP_3175		sc	sc	sc	nd	nd	nd	dioxygenase, ferredoxin reductase component, putative
PP_3198		sc	sc	sc	nd	nd	nd	ferredoxin, 2Fe-2S
PP_3325		sc	sc	sc	nd	nd	nd	outer membrane ferric siderophore receptor, putative
PP_3330		sc	sc	sc	nd	nd	nd	outer membrane ferric siderophore receptor, putative
PP_3555		sc	-2,03	-1,45	nd	nd	nd	FecR-type anti-sigma factor
PP_3575		sc	sc	sc	nd	nd	nd	outer membrane ferric siderophore receptor; TonB-dependent transducer
PP_3576		sc	sc	2,09	nd	nd	nd	FecR-type anti-sigma factor
PP_3577	ECF α -17	sc	sc	sc	nd	nd	nd	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
PP_3612		sc	4,24	3,75	nd	sc	sc	TonB-dependent receptor, putative

PP_3747	<i>glcF</i>	sc	sc	sc	nd	nd	nd	glycolate oxidase, iron-sulfur subunit
PP_3796	<i>pvdA</i>	-2,47	-2,72	-3,36	sc	-0,75	-0,68	L-ornithine N5-oxygenase
PP_3797	<i>fpvG</i>	sc	-1,35	-2,01	nd	nd	nd	conserved hypothetical protein
PP_3798	<i>fpvH</i>	sc	-1,66	-3,09	nd	nd	nd	conserved hypothetical protein
PP_3799	<i>fpvJ</i>	sc	-1,94	-3,40	nd	nd	nd	conserved hypothetical protein
PP_3800	<i>fpvK</i>	sc	-2,45	-2,91	nd	nd	nd	conserved hypothetical protein
PP_3801	<i>fpvC</i>	sc	-1,98	-3,48	nd	nd	nd	cation ABC transporter, periplasmic cation-binding protein, putative
PP_3802	<i>fpvD</i>	sc	-2,18	-2,63	sc	sc	sc	cation ABC transporter, ATP-binding protein, putative
PP_3803	<i>fpvE</i>	sc	-2,12	-2,49	nd	nd	nd	cation ABC transporter, permease protein, putative
PP_3804	<i>fpvF</i>	sc	-2,46	-3,04	sc	sc	sc	conserved hypothetical protein
PP_4208	<i>fpvI</i> (ECF α -6)	sc	1,63	2,52	nd	nd	nd	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
PP_4209	<i>pvdR</i>	sc	sc	sc	nd	nd	nd	ABC transporter permease
PP_4210	<i>pvdT</i>	-2,73	-1,48	sc	nd	nd	nd	pyoverdine ABC transporter ATP-binding protein/permease
PP_4211	<i>ompQ</i>	-2,25	sc	-1,68	nd	nd	nd	outer membrane pyoverdine efflux protein
PP_4212	<i>pvdP</i>	-1,70	sc	-2,30	nd	nd	nd	pyoverdine biosynthesis-like protein
PP_4213	<i>pvdM</i>	sc	sc	-1,69	nd	nd	nd	dipeptidase, putative
PP_4214	<i>pvdN</i>	-2,12	-1,41	-2,95	nd	nd	nd	pyoverdine biosynthesis-like protein
PP_4215	<i>pvdO</i>	-2,17	-1,70	-2,75	nd	nd	nd	pyoverdine biosynthesis-like protein
PP_4216	<i>pvdE</i>	-3,42	-2,40	-3,98	nd	nd	nd	pyoverdine ABC transporter ATP-binding protein/permease
PP_4217	<i>fpvA</i>	sc	-1,55	-2,71	sc	-0,77	-0,68	TonB-dependent outer membrane ferripyoverdine receptor FpvA
PP_4218		-3,25	-3,45	-3,96	sc	sc	sc	lipase/esterase family protein
PP_4219	<i>pvdD</i>	-3,62	-2,90	-3,88	sc	sc	sc	non-ribosomal peptide synthetase
PP_4220	<i>pvdJ</i>	-3,88	-3,08	-4,36	sc	sc	sc	non-ribosomal peptide synthetase
PP_4221	<i>pvdI</i>	-2,52	-1,77	-3,14	nd	nd	nd	non-ribosomal peptide synthetase
PP_4222	<i>syrP</i>	-3,28	-2,53	-3,66	nd	nd	nd	protein syrP
PP_4223	<i>pvdH</i>	-3,25	-2,51	-3,76	sc	sc	-0,58	diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase
PP_4243	<i>pvdL</i>	-2,95	-1,99	-3,36	sc	-1,04	nd	pyoverdine synthetase
PP_4244	<i>pvdS</i> (EFC α -4)	sc	sc	2,21	nd	nd	nd	ferric regulator
PP_4245	<i>pvdY</i>	-1,90	-1,32	-2,11	nd	nd	nd	siderophore biosynthesis protein, putative
PP_4259		sc	-1,38	-1,64	nd	nd	nd	iron-sulfur cluster-binding protein
PP_4264	<i>hemN</i>	-1,85	-2,11	nd	nd	sc	nd	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase
PP_4325	<i>ccmC</i>	sc	-1,33	sc	nd	nd	nd	heme ABC export system, permease protein CcmC
PP_4326	<i>ccmB</i>	sc	sc	sc	nd	nd	nd	heme ABC export system, permease protein CcmB
PP_4327	<i>ccmA</i>	sc	sc	sc	nd	nd	nd	heme ABC export system, ATP-binding protein CcmA
PP_4553	<i>ECFα-10</i>	sc	sc	sc	nd	nd	nd	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
PP_4606		sc	sc	sc	nd	nd	nd	outer membrane ferric siderophore receptor, TonB-dependent transducer
PP_4607		sc	1,93	1,89	nd	nd	nd	FecR-type anti-sigma factor
PP_4608	<i>ECFα-5</i>	sc	1,90	2,44	nd	nd	nd	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
PP_4611	<i>fecI</i>	sc	sc	2,46	nd	nd	nd	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily
PP_4612	<i>fecR</i>	sc	sc	1,86	nd	nd	nd	FecR anti-sigma factor
PP_4613	<i>fecA</i>	sc	sc	sc	nd	nd	nd	outer membrane iron(III) dicitrate receptor, TonB-dependent transducer

PP_4646		sc	sc	sc	sc	sc	sc	ferredoxin--NADP+ reductase, putative
PP_4687	<i>phuV</i>	sc	1,62	1,60	nd	nd	nd	heme/hemin ABC transporter, ATP-binding protein
PP_4688	<i>phuU</i>	sc	1,98	2,13	nd	nd	nd	heme/hemin ABC transporter, permease protein
PP_4689	<i>phuT</i>	sc	sc	1,55	nd	nd	nd	heme/hemin ABC transporter, periplasmic heme/hemin-binding protein
PP_4730	<i>fur</i>	sc	sc	1,28	sc	sc	sc	transcriptional regulator Fur
PP_4755		sc	1,57	sc	nd	nd	nd	outer membrane ferrichrome-iron receptor, TonB-dependent transducer
PP_4856		sc	sc	sc	nd	nd	nd	bacterioferritin, putative
PP_4881		sc	sc	1,22	sc	sc	sc	iron ABC transporter, periplasmic iron-binding protein, putative
PP_4882		sc	1,41	1,47	nd	nd	nd	iron ABC transporter, permease protein
PP_4900		sc	sc	sc	nd	nd	nd	iron-sulfur cluster-binding protein, putative
PP_5124		sc	sc	sc	nd	nd	nd	ferredoxin, 4Fe-4S
PP_5195		sc	1,05	1,58	nd	nd	nd	iron ABC transporter, permease protein, putative
PP_5196	<i>fbpA</i>	sc	1,59	2,72	sc	sc	sc	iron ABC transporter, periplasmic iron-binding protein, putative
PP_5212		sc	sc	sc	nd	nd	nd	oxidoreductase, iron-sulfur-binding
PP_5306	<i>exbB</i>	1,38	2,96	3,96	sc	sc	sc	ferric siderophore transport system protein ExbB
PP_5307	<i>exbD</i>	1,85	3,39	4,34	sc	sc	sc	ferric siderophore transport system, inner membrane protein ExbD
PP_5308	<i>tonB</i>	sc	2,72	3,58	nd	nd	nd	ferric siderophore transport system, periplasmic binding protein TonB

10 ANEXOS: PUBLICACIONES

Effect of Crc and Hfq proteins on the transcription, processing, and stability of the *Pseudomonas putida* CrcZ sRNA

SOFÍA HERNÁNDEZ-ARRANZ,¹ DIONE SÁNCHEZ-HEVIA, FERNANDO ROJO, and RENATA MORENO

Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

ABSTRACT

In *Pseudomonas putida*, the Hfq and Crc proteins regulate the expression of many genes in response to nutritional and environmental cues, by binding to mRNAs that bear specific target motifs and inhibiting their translation. The effect of these two proteins is antagonized by the CrcZ and CrcY small RNAs (sRNAs), the levels of which vary greatly according to growth conditions. The *crcZ* and *crcY* genes are transcribed from promoters *PcrcZ* and *PcrcY*, respectively, a process that relies on the CbrB transcriptional activator and the RpoN σ factor. Here we show that *crcZ* can also be transcribed from the promoter of the immediate upstream gene, *cbrB*, a weak constitutive promoter. The *cbrB-crcZ* transcript was processed to render a sRNA very similar in size to the CrcZ produced from promoter *PcrcZ*. The processed sRNA, termed CrcZ*, was able to antagonize Hfq/Crc because, when provided in *trans*, it relieved the deregulated Hfq/Crc-dependent hyperrepressing phenotype of a Δ *crcZ* Δ *crcY* strain. CrcZ* may help in attaining basal levels of CrcZ/CrcZ* that are sufficient to protect the cell from an excessive Hfq/Crc-dependent repression. Since a functional sRNA can be produced from *PcrcZ*, an inducible strong promoter, or by cleavage of the *cbrB-crcZ* mRNA, *crcZ* can be considered a 3'-untranslated region of the *cbrB-crcZ* mRNA. In the absence of Hfq, the processed form of CrcZ was not observed. In addition, we show that Crc and Hfq increase CrcZ stability, which supports the idea that these proteins can form a complex with CrcZ and protect it from degradation by RNases.

Keywords: global regulation of gene expression; catabolite repression; small RNAs; RNA processing; bacteria

INTRODUCTION

Small RNAs (sRNAs) are key elements in controlling the expression of bacterial genomes. They act post-transcriptionally, usually to inhibit translation of a given mRNA, although some can also activate translation or bind to and regulate the activity of specific proteins (Frohlich and Vogel 2009; Bobrovskyy and Vanderpool 2013; Wagner and Romby 2015). In addition to controlling the expression of specific genes, their influence on diverse transcriptional regulators allows them to modulate important regulatory networks (Romby et al. 2006; Waters and Storz 2009; Storz et al. 2011; Mandin and Guillier 2013). sRNAs are particularly useful for controlling rapid responses to environmental or physiological signals (Wassarman 2002; Bobrovskyy and Vanderpool 2013). For a metabolically versatile bacterium that thrives in a constantly changing environment, a rapid response can be especially important to allow it to profit from transitory nutrients.

Bacteria of the genus *Pseudomonas* are a clear example in this respect. They are metabolically and physiologically very flexible and have a considerable adaptive capacity that allows them to thrive in many different environments, even in extreme conditions (Silby et al. 2011; Wu et al. 2011; Moreno and Rojo 2014). Several recently described sRNAs have key roles in controlling many aspects of *Pseudomonas* physiology (Sharma and Storz 2011; Sonnleitner and Haas 2011; Gómez-Lozano et al. 2015). One of these, CrcZ, participates in a complex regulatory network that modulates the expression of many genes involved in nutrient assimilation, thus optimizing metabolism and improving growth (Sonnleitner et al. 2009; Moreno et al. 2012). CrcZ is found in all *Pseudomonas* for which the genome sequence is available. Many *Pseudomonas* species contain, in addition to CrcZ, other very similar sRNAs that are functionally redundant, such as CrcY in *Pseudomonas putida* (Moreno et al. 2012) or CrcX in *Pseudomonas syringae* (Filiatrault et al. 2013). CrcZ

¹Present address: CRAG; Campus UAB, Edifici CRAG Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, 08193 Barcelona, Spain

Corresponding authors: frojo@cnb.csic.es, rmoreno@cnb.csic.es

Article published online ahead of print. Article and publication date are at <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.058313.116>.

© 2016 Hernández-Arranz et al. This article is distributed exclusively by the RNA Society for the first 12 months after the full-issue publication date (see <http://rnajournal.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml>). After 12 months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

and its sRNA homologs regulate gene expression in association with the Hfq and Crc proteins.

Hfq is a hexameric RNA-binding protein that can recognize specific targets in RNAs and has a central role in post-transcriptional gene regulation. In *Escherichia coli*, it can facilitate the annealing of sRNAs to specific mRNAs to modulate translation, influence RNA decay, and enable the assembly of some ribonucleoprotein complexes (for recent reviews, see Vogel and Luisi 2011; Sobrero and Valverde 2012; De Lay et al. 2013; Wagner and Romby 2015). In *Pseudomonas*, Hfq is a global regulator that influences diverse features such as growth, metabolism, virulence, motility, quorum sensing, and tolerance to stress (Sonnleitner et al. 2006; Sonnleitner and Blasi 2014; Arce-Rodriguez et al. 2015; Madhushani et al. 2015; Moreno et al. 2015).

The Crc protein cooperates with Hfq to form stable complexes with RNAs bearing an A-rich motif with the consensus sequence AANAAAnAA. Although Crc was initially thought to bind RNA on its own (Moreno et al. 2009; Sonnleitner et al. 2009), recent results indicate that this is not the case, but rather that Hfq is the protein that initially recognizes the A-rich motif (Sonnleitner and Blasi 2014). The Crc protein appears to stabilize the Hfq–RNA complex and forms a tripartite Hfq–RNA–Crc complex (Madhushani et al. 2015; Moreno et al. 2015). Several mRNAs that specify proteins involved in the uptake and metabolism of carbon sources, or in other physiological processes, bear A-rich Hfq targets that overlap the translation initiation site; Hfq/Crc binding to these targets inhibits translation initiation (Sonnleitner and Blasi 2014; Madhushani et al. 2015; Moreno et al. 2015).

When cells grow in nutritionally rich conditions, a situation that elicits a carbon catabolite repression (CCR) response, the repressive effect of Hfq and Crc is strong. In contrast, when the preferred nutrient-rich compounds are consumed or are lacking, the effect of Hfq/Crc is low or undetectable. Hfq and Crc levels are similar in distinct growth conditions (Moreno et al. 2015). *CrcZ* levels (and those of homologous sRNAs such as *CrcY*) vary greatly in response to nutritional cues, however, and are inversely proportional to the strength of the inhibitory effect of Hfq and Crc proteins. *CrcZ* and its homologous sRNAs have several A-rich motifs and can bind Hfq/Crc in vitro. It was thus suggested that these sRNAs counteract Hfq/Crc repression by sequestering one or both proteins, making them unavailable to act on mRNAs with A-rich motifs. *CrcZ*/*CrcY* levels are low in nutritionally rich conditions, which would allow Hfq/Crc proteins to repress target mRNAs. When nutrients are scarce or render low energetic return, *CrcZ*/*CrcY* levels increase and could then sequester Hfq/Crc proteins, impeding their action on target mRNAs (Sonnleitner et al. 2009; Moreno et al. 2012; Filiatrault et al. 2013; Valentini et al. 2014).

The role of the Hfq/Crc/*CrcZ*–*CrcY* regulatory system in controlling gene expression, and the underlying molecular mechanisms, have been studied in some detail in

Pseudomonas putida, a ubiquitous soil bacterium that has become an important model system in biotechnology (Poblete-Castro et al. 2012; Nikel et al. 2014). The *P. putida* *crcZ* and *crcY* genes are transcribed from promoters *P_{crcZ}* and *P_{crcY}*, respectively, which require the CbrB transcriptional activator and the RNA polymerase form bound to the RpoN alternative σ factor (Moreno et al. 2012; García-Mauriño et al. 2013). The activity of these promoters varies considerably, depending on the nutritional conditions. The *crcY* gene can also be transcribed from an unknown promoter upstream of *P_{crcY}*. The resulting transcript is processed to render a sRNA similar in size to that of *CrcY* (García-Mauriño et al. 2013); the possible function of this processed transcript was not studied.

Here we show that *crcZ* is transcribed not only from *P_{crcZ}*, but from the promoter of the *cbrB* gene, located immediately upstream of *crcZ*. The *cbrB*–*crcZ* transcript is processed to render a sRNA very similar in size to the primary *CrcZ* produced from *P_{crcZ}*. This suggests that *crcZ* is a 3′-untranslated region (3′-UTR) of *cbrB* that can generate a sRNA either from *P_{crcZ}* or by cleavage of the *cbrB*–*crcZ* mRNA. We analyzed the ability of the processed form of *CrcZ* to control Hfq/Crc function in vivo. In addition, we show that Hfq and Crc protect the primary and processed *CrcZ* forms from cleavage by ribonucleases, thus increasing their stability. Our data support a model that explains how the Hfq/Crc/*CrcZ* regulatory system could react to nutritional signals.

RESULTS

Cells lacking RpoN contain substantial amounts of *CrcZ* sRNA

In agreement with reports that promoter *P_{crcZ}* requires the CbrB transcriptional activator and the RpoN–RNA polymerase (Moreno et al. 2012; García-Mauriño et al. 2013), the β -galactosidase activity derived from a plasmid-borne *P_{crcZ}*–*lacZ* transcriptional fusion was very low in *P. putida* cells that lacked the RpoN σ factor or the CbrB activator (Fig. 1A,B). Based on this finding, the amount of *CrcZ* in these mutant strains should be low or undetectable; nonetheless, real-time RT–PCR monitoring of *crcZ* transcript levels (or transcripts including *crcZ* sequences) showed that the abundance of *crcZ* transcripts in the RpoN-null strain was similar to that of the wild-type strain, both during exponential growth in LB and in the stationary phase of growth (Fig. 1C). The CbrB-null strain behaved as predicted, with very low *crcZ* transcript levels (Fig. 1C). These results suggest that, at least in the RpoN-null strain, *crcZ* can be transcribed from an RpoN-independent promoter. The DNA segment in the *P_{crcZ}*–*lacZ* transcriptional fusion, including the promoter *P_{crcZ}*, spanned from the end of *cbrB* to the start of *crcZ* (plasmid pP_{crcZ}; Fonseca et al. 2013). Since this fusion was inactive in the RpoN-null strain, *crcZ* transcription in this strain must derive from an RpoN-independent promoter located

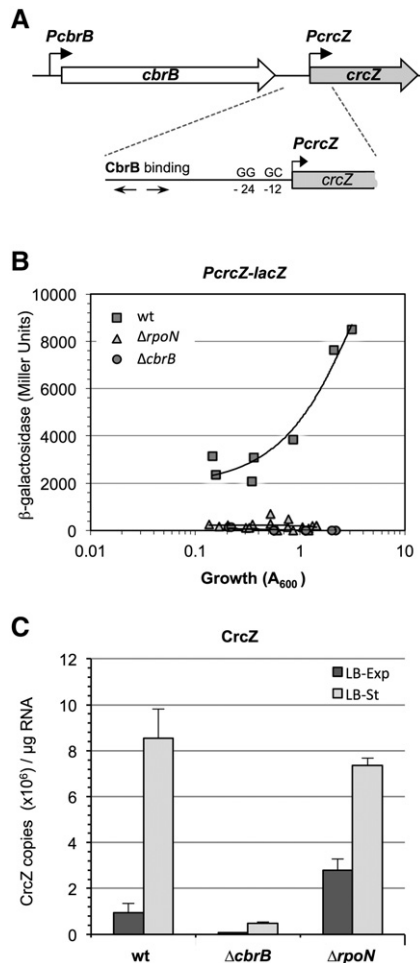


FIGURE 1. Influence of CbrB and RpoN on the activity of promoter *PcrcZ* and on CrcZ levels. (A) Scheme showing the location of promoter *PcrcZ*, the -12 and -24 consensus motifs for the RpoN σ factor, and the binding site for the CbrB transcriptional activator. (B) *P. putida* strains KT2442 (wt), MPO401 (*cbrB::km* derivative of KT2442, indicated as $\Delta cbrB$), and KT2442*rpoN::Ωkm* (*rpoN::Ωkm* derivative of KT2442, indicated as $\Delta rpoN$), transformed with plasmid pPcrZ (includes a *PcrcZ-lacZ* transcriptional fusion, but lacks *cbrB* sequences), were cultured in LB medium, and β -galactosidase levels were measured at different times. The plot shows the values obtained as a function of cell growth (turbidity at 600 nm). (C) CrcZ levels in the above strains, cultured in LB medium and collected at mid-exponential phase (A_{600} , 0.6; dark bars) or at the start of the stationary phase (turbidity, 2.2; light bars). RNA levels were determined by real-time RT-PCR; values shown are the mean \pm SD for three independent assays.

within *cbrB* or upstream of it. When sequenced, the chromosomal region spanning from the start of *cbrB* to *crcZ* in the RpoN-null strain was found to be identical to the same region in the wild-type strain. This rules out the presence of a new promoter in the RpoN-null strain that would explain the high *crcZ* transcript levels. This sequence identity also indicates that, in the wild-type strain, *crcZ* could be transcribed not only from *PcrcZ*, but also from an RpoN-independent promoter. The absence of *crcZ* transcripts in the MPO401 CbrB-null strain (García-Mauriño et al. 2013) is probably

due to the deletion of almost the entire *cbrB* gene, and to the kanamycin-resistance gene that replaces the deleted *cbrB* sequences and includes a transcriptional terminator that can stop transcription originated in upstream regions.

Identification of promoters upstream of *PcrcZ* that can drive *crcZ* transcription

To assess whether *crcZ* is under the influence of a promoter located upstream of *PcrcZ*, we performed reverse transcription-PCR assays with total RNA from the wild-type and RpoN-null strains, and various primer pairs designed to detect transcripts that originate upstream of *PcrcZ* and span into *crcZ*. Results confirmed the presence of a transcript that includes *crcZ* and originates between the end of *cbrB* and *PcrcZ*, within *cbrB*, or upstream of *cbrB* (Fig. 2A).

Two parallel approaches were used to locate this promoter. We first tested whether *crcZ* can be transcribed from the *cbrB* promoter, termed *PcbrB* (Amador 2011), or from an uncharacterized internal promoter within *cbrB*. The activity of a plasmid-borne transcriptional fusion of *cbrB* (including the *PcbrB* promoter) to *lacZ* was compared to that of a series of similar reporter fusions in which the 5'-end of *cbrB* had been trimmed progressively to eliminate *PcbrB* and downstream sequences (see Fig. 2B). Deletion of promoter *PcbrB* completely eliminated reporter gene transcription (Fig. 2C), indicating that *cbrB* has no internal promoters that could affect *crcZ*, and that the *crcZ* transcripts that originate upstream of *PcrcZ* might derive from promoter *PcbrB*.

Introduction of the *cbrB-lacZ* reporter fusion contained in plasmid pFW1 (see Fig. 2B,C) into the RpoN-null strain KT2442*rpoN::Ωkm*, showed that β -galactosidase levels were three times higher in the absence of RpoN than in its presence (Fig. 2D, left panel). Real-time RT-PCR assays confirmed that transcripts for *cbrB* were twofold more abundant in the RpoN-null than in the wild-type strain (Fig. 2D, right panel). *PcbrB* promoter activity can thus explain, at least in part, the presence of *crcZ* transcripts in the RpoN-null strain. This activity was nevertheless much lower than that of promoter *PcrcZ* in the same conditions (cf. Figs. 1B, 2C).

In an alternative approach, we used 5' RACE to test for the possible presence of a *crcZ* promoter in the vicinity of *PcrcZ* (Fig. 3A). RNA preparations from the wild-type and RpoN-null strains growing exponentially in LB medium were treated with the TEX nuclease (terminator 5'-phosphate-dependent exonuclease), which digests RNAs that have a 5' monophosphate, but is inactive on primary transcripts with a triphosphate at their 5' end. In the wild-type strain, the 5'-end of most of the transcripts detected (64%) corresponded to an A residue located 2 nucleotides (nt) downstream from the start site mapped by Moreno et al. (2012) and 1 nt downstream from that reported by García-Mauriño et al. (2013), both of which were determined using a primer extension approach. In the RpoN-null strain, many fewer clones

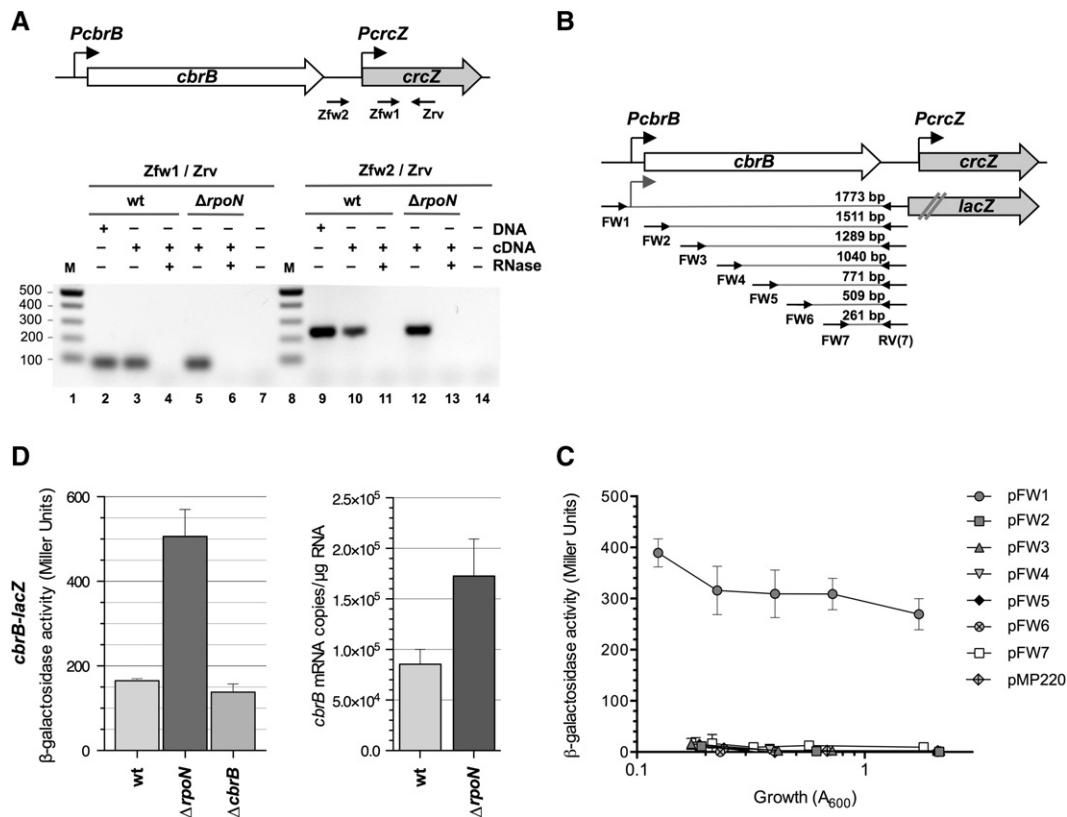


FIGURE 2. The *crcZ* gene can be transcribed from promoter *PcbrB*. (A) Identification of transcripts comprising *crcZ* that originate at or upstream of the promoter *PcbrB*, detected by RT-PCR. Total RNA from the wild-type (KT2442) and RpoN-null (KT2442*rpoN::Ωkm*) strains cultured in LB medium was purified, transformed to cDNA with reverse transcriptase and a primer that hybridized within *crcZ* (Zrv; see figure); the cDNA was amplified by PCR using forward primers that hybridized up- (Zfw2) or downstream (Zfw1) from promoter *PcbrB*, and the reverse Zrv primer that hybridized within *crcZ*. Control reactions to which RNase A was added, or in which the PCR was performed with genomic DNA, were included as controls. (M) DNA size ladder (in bp). (B) Transcriptional fusions of the *cbrB* gene, or of serial deletions affecting its 5'-region, to the *lacZ* reporter gene. The *cbrB* segments fused to *lacZ* were generated by PCR with forward primers FW1 to FW7, and with the reverse primer RV(7); note that only the segment generated with primer FW1 includes the *PcbrB* promoter and that none of the fusions includes the sequences corresponding to promoter *PcbrB* or *crcZ*. DNA segment size is indicated. (C) β -Galactosidase activity displayed by *P. putida* KT2440 harboring plasmids that include the transcriptional fusions constructed in B, named according to the corresponding forward primer. A strain bearing the plasmid vector used to construct the fusions (pMP220) was included as control. Cells were cultured in LB medium, samples were withdrawn at various times, and β -galactosidase activity was determined using ONPG as the substrate; data shown are the mean \pm SD for three independent assays. (D) Influence of RpoN on *cbrB* gene expression. The left panel shows the transcription of *cbrB*, as deduced from a *cbrB-lacZ* transcriptional fusion, in *P. putida* strains KT2442 (wt) and KT2442*rpoN::Ωkm* ($\Delta rpoN$), transformed with plasmid pFW1 (contains the *cbrB-lacZ* transcriptional fusion; see panel B). Cells were cultured in LB medium; at mid-exponential phase (A_{600} , 0.6), samples were taken and β -galactosidase activity was determined using ONPG as substrate. Data shown are the mean \pm SD for three independent assays. The right panel shows the abundance of *cbrB* transcripts in *P. putida* strains KT2442 (wt) and KT2442*rpoN::Ωkm* ($\Delta rpoN$), determined by real-time RT-PCR with RNA from cells cultured in LB medium and collected at mid-exponential phase (A_{600} , 0.6). The primers used for the PCR reaction hybridized at the central region of *cbrB*. Values show the mean \pm SD for three independent assays.

were isolated from the RACE assays, which suggests the absence of primary *crcZ* transcripts. In addition, the 5'-end indicated by the isolated clones mapped in most cases at positions 5–14 nt upstream of the +1 start site observed for *CrcZ* in the wild-type strain; 50% of these 5'-ends mapped at positions –5 and –6 (Fig. 3A). The heterogeneity of the 5'-ends suggests that they are processed transcripts that escaped the TEX treatment.

The 5' end of *crcZ* transcripts was also analyzed using primer extension assays performed with an end-labeled oligonucleotide primer. When using TEX-treated RNA samples, we detected an extension product in the wild-type strain, which corresponded to a transcript originated at the

transcription start site detected in the RACE assays (position +1; Fig. 3B). This extension product was barely visible in the RNA sample from the RpoN-null strain (Fig. 3B). In the absence of TEX treatment, most extension products in the RpoN-null strain samples were transcripts with 5' ends matching positions –6, –9, –11, or –13. Within the accuracy limits of the primer extension assays, these 5' ends coincide with those found using 5' RACE assays. The extension products with 5' ends in the –6 to –13 region were also detected in the TEX-untreated wild-type strain samples, although their abundance was much lower than in the RpoN-null strain and represented a minor fraction of overall *crcZ* transcripts (Fig. 3B). These results support the idea that promoter

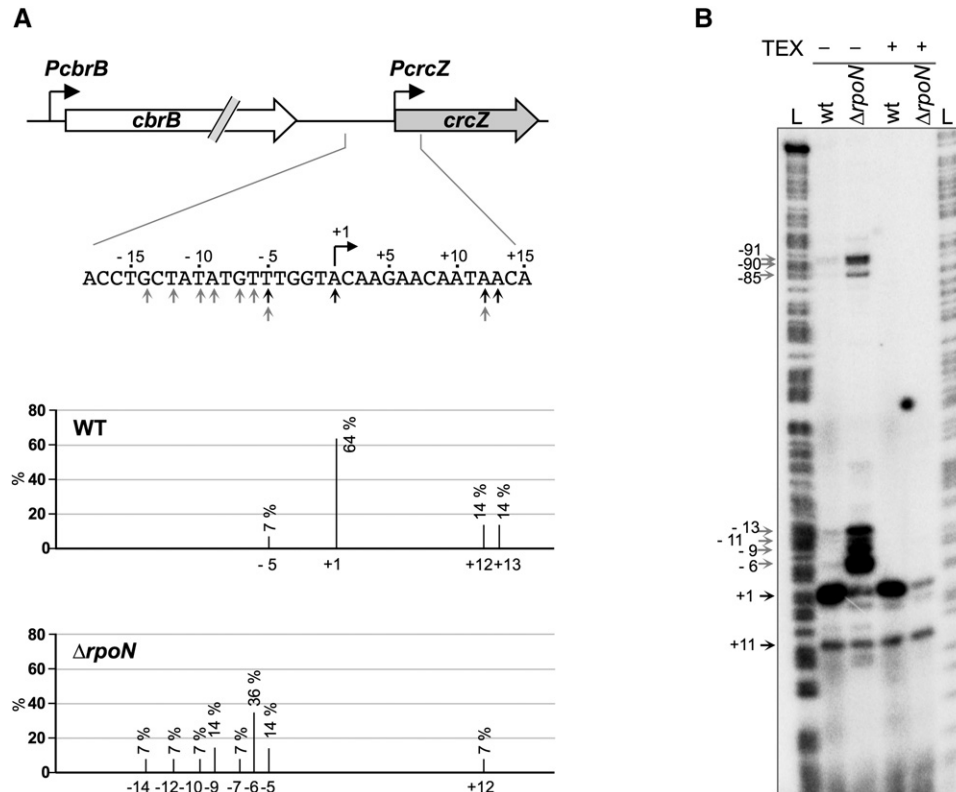


FIGURE 3. Identification of the 5' end of *crcZ* transcripts in wild-type and *rpoN* *P. putida* strains. Total RNA was obtained from *P. putida* KT2442 (wt) and KT2442 *rpoN::Ωkm* ($\Delta rpoN$) cultured in LB medium and the 5' end of the *crcZ* transcripts were determined using 5' RACE (A) or primer extension (B). (A) 5' RACE assays were performed with RNA samples previously treated with terminator 5'-phosphate-dependent exonuclease (TEX). Fourteen independent clones were sequenced for each strain; the 5' ends found for the wild type are indicated by black arrows, and those for the *rpoN* strain by gray arrows. The frequency with which each 5' end was found is indicated in the lower panels (in %). (B) Primer extension reactions were performed with an end-labeled oligonucleotide and RNA samples, untreated or treated with TEX enzyme, as indicated. The extended cDNA products were analyzed by electrophoresis on a denaturing 6% urea-polyacrylamide gel, in parallel with a DNA sequence ladder (L). Numbers (right) indicate the position of the 5' ends detected relative to the *crcZ* transcription start site (+1).

PcrcZ is inactive in the absence of RpoN and that additional promoters cannot be detected in this region. The transcripts detected in the RpoN-null strain are probably due to read-through transcription from *cbrB* and cleavage of the *cbrB*-*crcZ* transcripts.

The transcript originated at *PcbrB* can be processed to generate an sRNA similar to the primary *CrcZ*

When we used a probe for *crcZ*, Northern blot analysis of RNA samples from cells growing exponentially in LB medium showed that the RpoN-null strain bears a transcript that hybridizes to the probe and is very similar in size to *CrcZ* (Fig. 4). This transcript was barely detected in TEX-treated samples, which indicates that it is not a primary transcript, but derives from processing of a larger transcript that probably originated at the *PcbrB* promoter. This idea coincides with the results of the 5' RACE and primer extension assays for the RpoN-null strain (Fig. 3), which suggest a processing site located 5–9 nt upstream of the promoter *PcrcZ* +1 start site. For simplicity, these processed transcripts of very

similar size were collectively termed *CrcZ**. In the wild-type strain, however, most *crcZ* transcripts were TEX-resistant, although quantitation of the bands in three independent assays indicated that transcript levels decreased by ~20% after TEX treatment. This again suggests that processed *CrcZ** transcripts are also present in the wild-type strain.

Real-time RT-PCR assays performed with RNA from cells growing exponentially in LB medium showed that the number of transcripts that include *crcZ* sequences were much more abundant than those for *cbrB* (~10-fold for the wild-type strain and 16-fold for the RpoN-null strain; compare data in Fig. 1C and Fig. 2D). This suggests that, after cleavage of the *cbrB*-*crcZ* transcript, the 5'-segment for *cbrB* is rapidly degraded, while the fragment corresponding to *crcZ* is more stable and accumulates, particularly in the RpoN-null strain.

In the *CbrB*-null strain MPO401, neither the primary nor the processed *crcZ* transcripts were detected (Fig. 4). Primary transcripts that originated at *PcrcZ* are predicted to be absent in this strain, since this promoter relies on the *CbrB* activator, which is lacking. The absence of processed *crcZ* transcripts is probably the consequence of the kanamycin-resistance

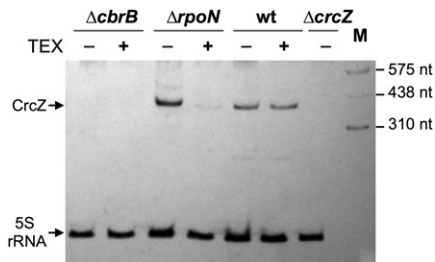


FIGURE 4. Identification of *CrcZ* sRNA by Northern blot in strains KT2442 (wt), MPO401 ($\Delta cbrB$), KT2442 $rpoN::\Omega km$ ($\Delta rpoN$). Strain KT2440-Z, which has an inactivated *crcZ::tet* allele and lacks *CrcZ*, is included as control (indicated as $\Delta crcZ$). Total RNA was obtained from cells growing exponentially in LB medium (A_{600} , 0.6). RNA samples were untreated or treated with TEX, resolved on a 6% polyacrylamide/7 M urea gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the presence of *CrcZ* and 5S rRNA determined by hybridization with specific probes. Lane M corresponds to an RNA size ladder.

determinant that interrupts the *cbrB* gene in this strain, and stops transcripts that originate at promoter *PcbrB*.

The processed form of *CrcZ* can antagonize Hfq/*Crc* function, complementing the hyperrepressing phenotype of a $\Delta crcZ\Delta crcY$ double mutant

Our results showed that cells can bear two *CrcZ* variants, the primary *CrcZ* and the processed *CrcZ*^{*}. The processed form is the predominant, if not the only variant in the RpoN-null strain, whereas most *CrcZ* in the wild-type strain corresponds to the primary transcript. Prediction of the secondary structure of *CrcZ*^{*} and *CrcZ*, using the RNAfold software package (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>), suggested that the overall structure of these sRNAs is highly similar. Although there are some local modifications due to the extra nucleotides present at the *CrcZ*^{*} 5'-end, they are small, and the stem-loops that include the Hfq binding sites remain unchanged (not shown). We thus assessed whether the processed *CrcZ*^{*} variant is functional and can antagonize the repressing activity of Hfq/*Crc* proteins, which would open up a possible role for *CrcZ*^{*} in the CbrB/Hfq/*Crc* regulatory system. We previously reported that a mutant *P. putida* strain bearing inactivated *crcZ* and *crcY* genes, and therefore lacking all forms of *CrcZ* and *CrcY*, is unable to grow in a minimal salts medium containing benzoate or citrate as the sole carbon source, and it has a markedly reduced growth rate when glucose, fumarate, or succinate are provided as the carbon source (Moreno et al. 2012). Since the wild-type strain can grow efficiently using any of these compounds, we proposed that lack of *CrcZ* and *CrcY* (and of its processed forms, *CrcZ*^{*} and *CrcY*^{*}) deregulates the Hfq/*Crc* system, leading to strong, constitutive Hfq/*Crc*-dependent repression of genes involved in the uptake and assimilation of these nonpreferred carbon sources (Moreno et al. 2012).

To test whether *CrcZ*^{*} expression in *trans* complements the $\Delta crcZ\Delta crcY$ strain growth defects, two plasmids were con-

structed. The first, p421-Pwt, bore a DNA segment that includes the *cbrB* and *crcZ* genes (expressed from their native promoters, *PcbrB* and *PcrcZ*) and can therefore generate *CrcZ* and *CrcZ*^{*} (see Fig. 5A). The second plasmid, p421-Pmut, has a variant of this DNA fragment in which the GG and GC nucleotides at the consensus -24 and -12 regions of promoter *PcrcZ* were modified to CC and TT, respectively. This was predicted to inactivate promoter *PcrcZ*, such that plasmid p421-Pmut would generate the processed *CrcZ*^{*} form but not the primary *CrcZ* transcript. To verify that the mutations inactivated *PcrcZ*, a DNA segment from p421-Pmut spanning from the end of *cbrB* to the promoter *PcrcZ* start site was PCR amplified and cloned into the pMP220 reporter plasmid, generating a transcriptional fusion to the *lacZ* indicator gene. The plasmid obtained, pPcrZmut, was introduced into strain KT2440, and its ability to produce β -galactosidase was compared to that of plasmid pPcrZ, which bears a wild-type *PcrcZ* promoter. As predicted, the mutant promoter was totally inactive (Fig. 5B).

We introduced plasmids p421-Pwt and p421-Pmut into the $\Delta crcZ\Delta crcY$ strain KT2440-ZY and analyzed their ability to produce *CrcZ* and/or *CrcZ*^{*}. As control, the empty plasmid vector (pSEVA421) was also introduced into strain KT2440-ZY. Northern blot analysis showed that plasmid p421-Pwt allowed production of an sRNA that hybridizes to the *CrcZ* probe and whose abundance decreases little after TEX treatment (Fig. 5C). This suggests that most sRNA produced is primary *CrcZ*, although *CrcZ*^{*} would also be present. In contrast, the sRNA species produced by plasmid p421-Pmut was completely degraded by TEX treatment, indicating that this plasmid generates *CrcZ*^{*} but not primary *CrcZ*. Real-time RT-PCR indicated that, in cells growing exponentially in LB medium, the amount of *CrcZ*^{*} in the mutant strain KT2440-ZY containing p421-Pmut was similar to that of *CrcZ* in the wild-type KT2440 strain (Fig. 5D); nonetheless, the amount of *CrcZ* produced from plasmid p421-Pwt in strain KT2440-ZY was twice as high.

We next analyzed the ability of plasmids p421-Pwt and p421-Pmut to restore the growth defect of strain KT2440-ZY in a minimal salts medium containing citrate, benzoate, glucose, or succinate as the sole carbon source. When using citrate or benzoate, the control strain KT2440-ZY (pSEVA421) could not grow even after 24 h in culture, while the wild-type strain KT2440(pSEVA421) grew efficiently (Fig. 6). The presence of plasmid p421-Pwt in the *CrcZ*/*CrcY*-null strain KT2440-ZY fully restored growth, with a growth rate similar to that of the wild-type KT2440 strain. This suggests that the *CrcZ* and *CrcZ*^{*} sRNAs produced from plasmid p421-Pwt can complement the growth defect of strain KT2440-ZY when citrate or benzoate are the only carbon source available. Plasmid p421-Pmut, which generates *CrcZ*^{*} but not the primary *CrcZ* (see Fig. 5C), provided partial complementation, since cells grew slowly and cultures eventually reached turbidity values similar to those of the wild-type strain after 24 h culture (Fig. 6). This suggests

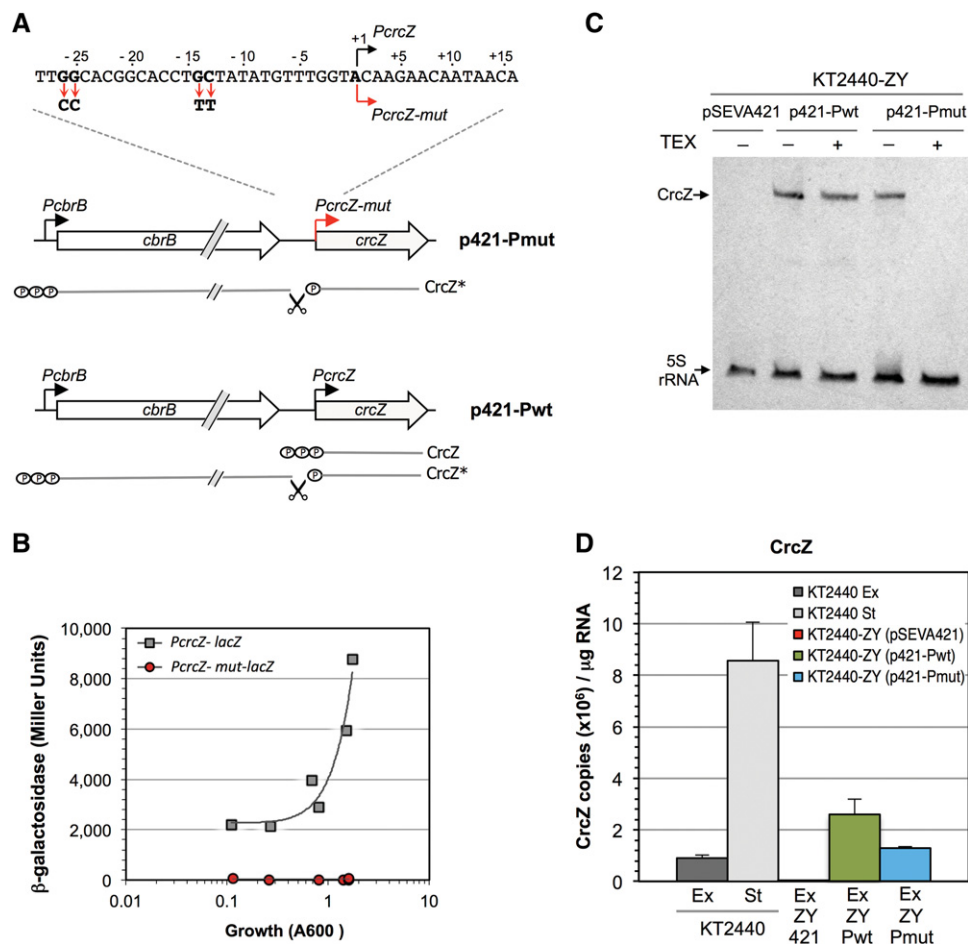


FIGURE 5. Plasmids designed to produce CrcZ and CrcZ*, or only CrcZ*. (A) Scheme of the insert in plasmids p421-Pwt and p421-Pmut. Plasmid p421-Pwt bears the *cbrB* and *crcZ* genes. Plasmid p421-Pmut contains *cbrB* and a mutant variant of *PcrCZ* in which the GG and GC nucleotides of the -24 and -12 regions, critical for recognition by RpoN-RNA polymerase, were modified (indicated in the blow-up). The RNAs predicted in each case are indicated. (B) *P. putida* strain KT2440 containing plasmid pPcrCZ (includes a *PcrCZ-lacZ* transcriptional fusion) or pPcrCZmut (includes a similar transcriptional fusion, with the mutant *PcrCZmut* promoter described in A), were cultured in LB medium and β -galactosidase levels measured at different times. The plot shows values obtained as a function of cell growth. (C) Northern blot identification of CrcZ/CrcZ* in strain KT2440-ZY containing plasmids pSEVA421 (control), p421-Pwt, or p421-Pmut. Total RNA from cells growing exponentially in LB medium was untreated or treated with TEX, resolved on a denaturing polyacrylamide/urea gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the presence of CrcZ and 5S rRNA determined by hybridization with specific probes. (D) The amount of CrcZ/CrcZ*, determined by real-time RT-PCR, in strains KT2440 and KT2440-ZY containing the plasmids is indicated in C; total RNA was purified from cells cultured in LB medium and collected at mid-exponential phase (A_{600} of 0.6; "Ex") or in stationary phase (A_{600} of 2.2; "St").

that CrcZ* can at least partially antagonize the inhibitory effect of Hfq/Crc. Most likely, complementation is only partial because the amount of CrcZ* produced from the weak *PcbrB* promoter is lower than that of CrcZ generated from the strong *PcrCZ* promoter.

Lack of CrcZ and CrcY had a less severe effect when strain KT2440-ZY used glucose or succinate as the carbon source; cells grew slowly, although after 24 h, turbidity values were high (Fig. 6). Plasmid p421-Pmut could effectively complement the lack of CrcZ and CrcY, particularly when succinate was the carbon source (Fig. 6). Since this plasmid allows production of CrcZ*, but not of the primary CrcZ, its ability to restore the growth of strain KT2440-ZY on glucose or succinate further shows that the processed CrcZ* form can at least

partially antagonize the repressive effect of the Hfq/Crc proteins, supporting that it is functional.

Since the amount of CrcZ* present in a wild-type strain is low, it can be asked whether it plays an active role in the modulation of Hfq/Crc-dependent catabolite repression when growth conditions change from a situation of high repression (for example, a complete medium) to one of low repression (a poor carbon source available). We therefore analyzed whether the amount of CrcZ* produced from promoter *PcbrB* is high enough to relieve the Hfq/Crc-dependent repression of the *benA* gene, which codes for the first enzyme of the benzoate assimilation pathway. Transcription of *benA* requires the BenR transcriptional activator. Earlier work showed that the Hfq/Crc system inhibits translation

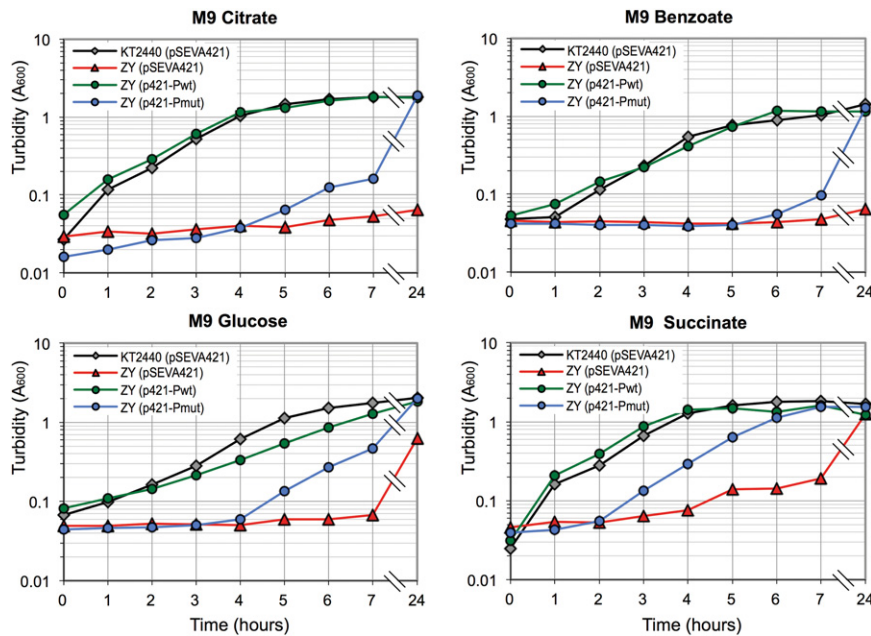


FIGURE 6. Growth of *P. putida* strains KT2440 (wild type) and KT2440-ZY (a $\Delta crcZ\Delta crcY$ derivative of strain KT2440), containing plasmids pSEVA421 (vector with no insert), p421-Pwt (produces *CrcZ* and *CrcZ**), or p421-Pmut (produces *CrcZ**), in M9 minimal salts medium containing citrate, benzoate, glucose, or succinate as sole carbon source. Note discontinuity in the time scale after hour 7.

of *benR* mRNA, which bears an A-rich motif to which Hfq/Crc bind (Moreno and Rojo 2008; Hernández-Arranz et al. 2013). As a result, in cells growing exponentially in benzoate-containing LB medium, Hfq/Crc keep BenR levels below those needed for an efficient induction of the *benA* gene, exerting an indirect but strong inhibition of *benA* transcription (Morales et al. 2004; Moreno and Rojo 2008; Moreno et al. 2012; Hernández-Arranz et al. 2013).

The indirect Hfq/Crc-dependent inhibition of *benA* transcription can be monitored using *P. putida* strain PBA1, which bears a *PbenA-lacZ* transcriptional fusion in its chromosome, and its derivatives PBA1C (*Crc*-null) and PBAZY (*CrcZ*-null, *CrcY*-null; lacking all forms of these sRNAs) (Moreno and Rojo 2008; Moreno et al. 2012). Plasmids p421-Pwt and p421-Pmut were introduced into strain PBAZY, while the empty plasmid vector pSEVA421 was introduced into strains PBA1, PBAZY, and PBA1C, as controls. The ability of benzoate to induce transcription from promoter *PbenA* was followed in all strains by measuring β -galactosidase production in cells cultured in LB medium with 5 mM benzoate. β -Galactosidase expression in strain PBA1 (pSEVA421) was strongly inhibited during the exponential growth phase until the culture reached a turbidity of ~ 1 – 1.5 , when cells prepared to enter the stationary phase and Hfq/Crc-dependent repression was relieved (see Fig. 7), a process that coincides with a strong increase in *CrcZ*/*CrcY* levels (Moreno et al. 2012). Repression was not observed in the *Crc*-null strain, as predicted. In strain PBAZY, however, repression was strong and did not disappear after entry into stationary phase, as would be

anticipated for a strain with a deregulated, constitutively active Hfq/Crc repression system. Introduction of plasmid p421-Pwt into strain PBAZY partially relieved repression, probably because the plasmid provides several copies of the *cbrB* and *crcZ* genes that give rise to increased *CrcZ* dosage (see Fig. 5D). The presence of p421-Pmut in strain PBAZY had no apparent effect. This plasmid allows production of *CrcZ** but not of *CrcZ*. Since the results presented in Figure 6 had indicated that *CrcZ** can at least partially antagonize the inhibitory effect of Hfq/Crc, the observation that it cannot relieve the Hfq/Crc-dependent inhibition of *benA* transcription suggests that the levels of *CrcZ** produced from plasmid p421-Pmut are not high enough to counteract the Hfq/Crc-dependent inhibition of *benA* expression. In support of this idea, real-time RT-PCR assays (Fig. 5D) indicated that *CrcZ** levels in a $\Delta crcZ\Delta crcY$ strain containing plasmid p421-Pmut and growing exponentially in LB medium are about half those of *CrcZ* + *CrcZ** generated from p421-Pwt, and very similar to those seen in the wild-type strain, levels that allow a strong Hfq/Crc-dependent repression. In addition, since plasmid p421-Pmut generates *CrcZ** from promoter *PcbrB*, which is weak and constitutive, the amount of *CrcZ** cannot increase in the stationary phase, and therefore Hfq/Crc-dependent repression of promoter *PbenA* is not relieved in the stationary phase, in contrast to what is observed when the primary *CrcZ* is expressed from the strong and inducible *PcrcZ* promoter. Altogether, the results presented suggest that the amounts of *CrcZ** present in the cell are not sufficient to counteract the strong CCR effect that occurs in a complete medium, but can contribute to provide a basal protection from an excessive Hfq/Crc-dependent repression.

Influence of Crc and Hfq proteins on *CrcZ* expression, stability, and processing

P. putida *CrcZ* levels decrease considerably following inactivation of the *crc* gene (García-Mauriño et al. 2013). This effect has been traced to a reduction in promoter *PcrcZ* activity when the *Crc* protein is absent. Although the underlying reasons are unclear, the authors proposed that *Crc* inhibits translation of an mRNA encoding a transcriptional repressor that inhibits *PcrcZ* activity. The effect of Hfq on *CrcZ* levels and *PcrcZ* activity was unknown. Northern blot analysis showed that lack of Hfq also led to a marked decrease in *CrcZ* levels (Fig. 8A), which was confirmed by real-time RT-PCR (not shown). The absence of Hfq also had a negative

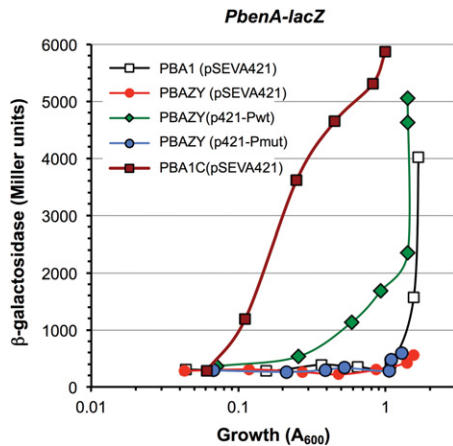


FIGURE 7. *P. putida* strains PBA1 (contains a *PbenA-lacZ* transcriptional fusion in its chromosome), PBA1C (a *Crc*-null derivative of strain PBA1), or PBAZY (a Δ *crcZ* Δ *crcY* derivative of strain PBA1), where indicated containing plasmids pSEVA421, p421-Pwt, or p421-Pmut, were cultured in LB medium with 5 mM benzoate, and β -galactosidase levels were measured at different times. The plot shows the values as a function of cell growth (turbidity at 600 nm). Exponential growth declined at a turbidity of ~ 1.5 , when cells prepared to enter the stationary growth phase.

effect on promoter *PcrcZ* activity (Fig. 8B). The strong decrease in *CrcZ* when *Crc* or *Hfq* proteins are absent might nonetheless be due not only to reduced *PcrcZ* activity, but also to reduced sRNA stability, since the *CrcZ* sRNA has several A-rich motifs that are very similar to RNase E targets.

As *Hfq*/*Crc* binding to *CrcZ* might protect the sRNA from RNase degradation, which could affect *CrcZ* levels, we analyzed the influence of *Crc* and *Hfq* on *CrcZ* stability. Since *CrcZ* levels in cells lacking *Crc* or *Hfq* are essentially undetectable, we introduced plasmid p424-Z, which allows *crcZ* transcription from the heterologous IPTG-inducible *Ptrc* promoter, into *P. putida* strains KT2440 Δ *hfq* (*Hfq*-null) and KTCRC (*Crc*-null). As a control, the same plasmid was introduced into the *CrcZ*-null strain KT2440-Z, which is wild type for *Crc* and *Hfq* and in which all *CrcZ* must be generated from plasmid p424-Z. The three strains were cultured in LB medium with 1 mM IPTG (to induce *crcZ* transcription); cells were collected at mid-exponential phase, their RNA extracted, and *CrcZ* levels were analyzed by Northern blot and real-time RT-PCR. In the strain bearing wild-type *crc* and *hfq* alleles, *CrcZ* overproduction led to the appearance of two similarly sized bands that hybridized to the probe (Fig. 9A; lanes labeled " Δ *crcZ*"). The larger band was TEX-resistant and probably corresponds to a primary, plasmid-produced *crcZ* transcript that contains 62 extra nucleotides at its 5'-end, which is the distance between the *Ptrc* promoter transcription start site and the first *crcZ* nucleotide. The smaller band was similar in size to the *CrcZ* sRNA in the wild-type KT2440 strain (Fig. 9A, labelled "wt") and was selectively degraded by TEX. This smaller band probably corresponds to a processed transcript that has lost most or all of the 62-nt extra

tail at the 5' end. This processed transcript was not observed in the *Hfq*-null strain. This suggests that *Hfq* facilitates this processing or, alternatively, that *Hfq* protects *CrcZ* from degradation by RNases, protection that would be more important for the processed transcript than for the primary transcript. Although the processed *crcZ* transcript was detected in the *Crc*-null strain, it was somewhat smaller than in the wild-type strain (Fig. 9A), which suggests that *Crc* influences the structure of the RNA-*Hfq* complex that facilitates processing and favors a defined excision site. Real-time RT-PCR assays to quantify the combined abundance of primary and processed *CrcZ* forms showed that, when *CrcZ* was overproduced by the plasmid, lack of *Crc* or *Hfq* reduced *CrcZ* steady-state levels by 2.5- and 3.7-fold, respectively (Fig. 9B), which coincides with Northern blot assay results.

To analyze the influence of *Crc* and *Hfq* on the stability of *crcZ* transcripts originated from plasmid p424-Z, *P. putida* strains KT2440-Z (*CrcZ*-null), KT2440 Δ *hfq* (*Hfq*-null), and KTCRC (*Crc*-null), all bearing plasmid p424-Z, were cultured in LB medium with IPTG, and transcription was blocked at mid-exponential phase by rifampicin addition. Samples were taken at different times, total RNA was purified from the cells, and *crcZ* transcript abundance was analyzed in

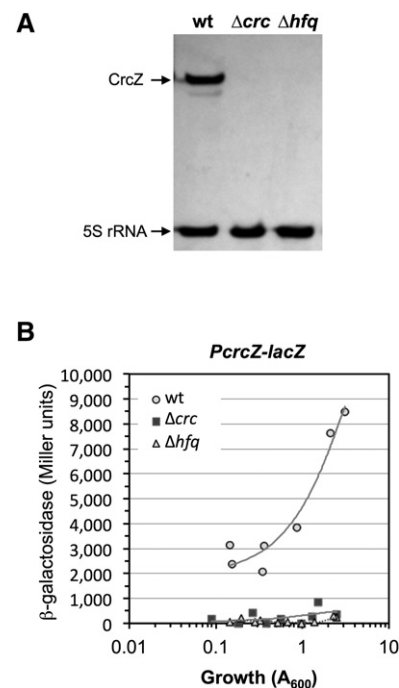


FIGURE 8. Amounts of *CrcZ* (A) and *PcrcZ* promoter activity (B) in *P. putida* strains KT2440 (wt), KTCRC (Δ *crc*), and KT2440 Δ *hfq* (Δ *hfq* derivative of KT2440). (A) Total RNA was obtained from cells growing exponentially in LB medium (A_{600} , 0.6), and *CrcZ* and 5S rRNA determined by Northern blot with specific probes. (B) The strains indicated above, transformed with plasmid pPcrZ (which bears a *PcrcZ-lacZ* transcriptional fusion), were cultured in LB medium. Samples were taken at different times and β -galactosidase levels measured using ONPG as substrate. Two independent assays were performed; results from both of them are shown.

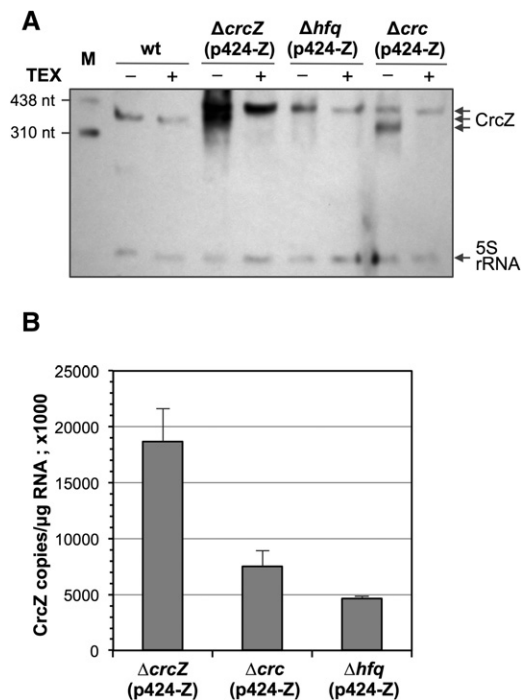


FIGURE 9. Overproduction of CrcZ in cells with wild-type, CrcZ-null, Hfq-null, or Crc-null genetic backgrounds. Plasmid p424-Z, which allows *crcZ* expression from the IPTG-inducible *P_{trc}* promoter, was introduced into *P. putida* strains KT2440-Z (Δ crcZ), KT2440 Δ hfq (Δ hfq), and KTCRC (a Δ crc derivative of KT2440). Cells were cultured in LB medium with streptomycin and 1 mM IPTG. At mid-exponential phase (A_{600} , 0.6), cells were collected and total RNA obtained. A wild-type KT2440 strain lacking plasmid p424-Z was cultured and processed in parallel. (A) RNA samples were untreated or TEX-treated, and CrcZ was analyzed by Northern blot as in Figure 4. Lane M shows an RNA size ladder. (B) The amount of CrcZ in RNA samples from strains bearing plasmid p424-Z, determined by real-time RT-PCR. Values show the mean \pm SD for three independent assays.

each sample by Northern blot. The half-life of the primary *crcZ* transcript produced from the plasmid *P_{trc}* promoter was ~ 6 min in the strain containing both Crc and Hfq (strain Δ crcZ), but decreased to ~ 3.8 min in the strain lacking Hfq, and to ~ 3 min when Crc was absent (Fig. 10A–C; summarized in Fig. 10D). The absence of Crc and Hfq thus reduces primary CrcZ stability by almost half. The pattern was similar for the processed *crcZ* transcript (higher electrophoretic mobility band in Northern blots); the absence of Crc reduced transcript half-life by almost half (from 6.8 to 3.8 min; Fig. 10E). It is worth noting that when Crc and Hfq proteins were both present, decay of the primary and the processed *crcZ* transcripts was delayed for ~ 4 min, after which their levels began to diminish. In the absence of Crc or Hfq, RNA decay began immediately.

DISCUSSION

Many sRNAs originate from noncoding genes located within intergenic regions, between protein-coding genes (Miyakoshi

et al. 2015). The CrcZ sRNA, present in all *Pseudomonas* for which the genome sequence is known, was thought to belong to this group, since it originates from a promoter (*P_{crcZ}*) located downstream from the *cbrB* gene. Here we show that *crcZ* can also be transcribed from the *cbrB* promoter, which generates a *cbrB-crcZ* transcript that is processed to render a sRNA very similar in size to that of the primary CrcZ produced from promoter *P_{crcZ}*. Processing occurred preferentially at a site 5–9 nt upstream of the 5'-end of the primary CrcZ. In a wild-type strain, these processed variants, collectively termed CrcZ*, account for a small percentage of the total CrcZ species. In the RpoN-null strain analyzed in this work, promoter *P_{crcZ}* is inactive and CrcZ* is the only species present, reaching levels similar to or higher than those of the primary CrcZ in the wild-type strain. The *crcZ* gene can thus be considered a 3'-untranslated region (3'-UTR) of *cbrB* that can generate a sRNA from *P_{crcZ}* or by cleavage of the *cbrB* mRNA 3'-UTR (see Fig. 11). Although these two sRNA variants have different 5'-ends, they share the transcriptional terminator at the *crcZ* 3'-end.

We present evidence that an artificial CrcZ variant with an unrelated 62-nt extra tail at its 5'-end is also processed to render a sRNA similar in size to the primary CrcZ (Figs. 9, 10). This finding suggests that processing depends on a sequence or structure downstream from the cleavage site, and that the upstream sequences are less important. A similar observation was recently made for the *E. coli* GlmZ sRNA, in which a central stem-loop is decisive for cleavage by RNase E, whereas the precise sequence at the cleavage site was not important (Gopel et al. 2016). We did not detect processing of the CrcZ variant with 62 extra nucleotides at its 5' end in the Hfq-null strain (Fig. 9), which implies that Hfq is involved in this processing or is needed to avoid transcript degradation by RNases. The *Vibrio cholerae* Hfq protein was similarly observed to participate in MicX transcript processing by RNaseE to generate a stable, more active sRNA (Davis and Waldor 2007).

In all *Pseudomonas* genomes analyzed to date, *crcZ* maps downstream from *cbrB* (Sonnleitner et al. 2009; Moreno et al. 2012; Filiatrault et al. 2013). Our finding that *cbrB* and *crcZ* are functionally linked and form a single transcriptional unit in *P. putida* suggests that *cbrB-crcZ* cotranscription, and possibly its processing to yield CrcZ*, might occur in other *Pseudomonas* species as well. The *P. putida* CrcY sRNA, which is very similar to CrcZ and functionally redundant, maps at a site distant from *crcZ*, downstream from the *mvaB* gene (Moreno et al. 2012). Like *crcZ*, *crcY* is transcribed from the CbrB-dependent *P_{crcY}* promoter, but transcripts that originate upstream of *mvaB* can run into *crcY*. This generates a transcript that can be processed to render sRNA similar in size to the primary CrcY generated from *P_{crcY}* (García-Mauriño et al. 2013). Therefore, CrcY can also be considered a 3'-UTR of *mvaB*. *Pseudomonas syringae* CrcZ and CrcX sRNAs are also proposed to arise from two promoters, one recognized by RpoN and the other by a different

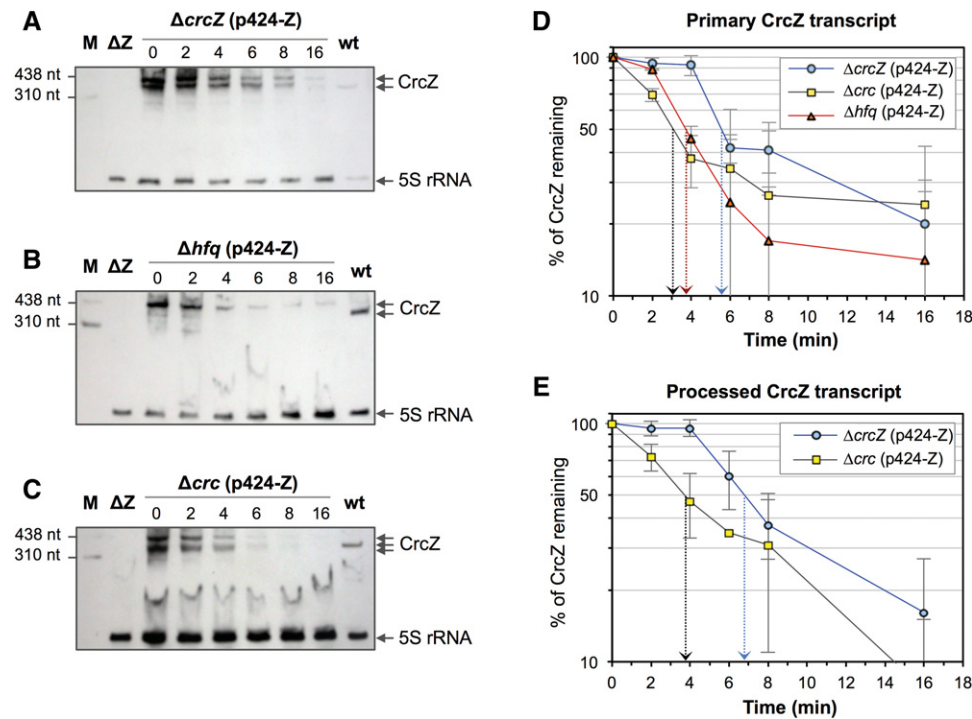


FIGURE 10. Half-life of CrcZ produced from plasmid p424-Z in cells with CrcZ-null, Hfq-null, or Crc-null genetic backgrounds. (A–C) *P. putida* strains KT2440-Z (ΔcrcZ), KT2440 Δhfq (Δhfq), and KTCRC (Δcrc) were cultured in LB medium with streptomycin and 1 mM IPTG. At a turbidity of 0.6 (A_{600}), rifampicin was added to stop transcription. Aliquots were withdrawn at 0, 2, 4, 8, 16, and 32 min post-rifampicin addition, total RNA was isolated, resolved on a 6% polyacrylamide/7 M urea gel, and CrcZ and 5S rRNA detected by Northern blot with specific probes. Band intensities were quantified using a ChemiDoc XRS imager and Image Lab software (Bio-Rad). Values obtained for the larger (primary CrcZ transcript) or shorter bands (processed CrcZ transcript) detected with the CrcZ probe were normalized to those of the 5S rRNA of the corresponding sample. (D,E) Plots show the values for each time point expressed relative to that at time 0. Processed CrcZ was not detected in the Δhfq strain. Data shown as mean \pm SD for three independent assays.

σ factor (Filiatrault et al. 2013). The coexistence of two forms of these sRNAs, a primary and a processed transcript of very similar sizes, could thus be common in *Pseudomonas*. Nesting a sRNA within a functionally related mRNA, with which it shares the intrinsic terminator, allows coupling a protein (a regulator) and a noncoding function (a sRNA) into a single expression unit that can be transferred horizontally to other bacteria (Miyakoshi et al. 2015).

There is evidence to support the idea that CrcZ* is a functional sRNA, able to antagonize the effect of Hfq and Crc. The growth of a $\Delta\text{crcZ}\Delta\text{crcY}$ strain that lacks all forms of CrcZ and CrcY is strongly impaired when nonpreferred compounds such as citrate, benzoate, glucose, or succinate are provided as the sole carbon source in a minimal salts medium. This growth defect most likely derives from a hyperrepressing effect of the Hfq and Crc proteins on functions necessary to assimilate these compounds, an effect that cannot be controlled because

CrcZ/CrcY and their processed variants are absent. Introduction of a plasmid that produces CrcZ*, but not CrcZ, into the $\Delta\text{crcZ}\Delta\text{crcY}$ strain partially complemented the hyperrepressing phenotype, allowing growth on the

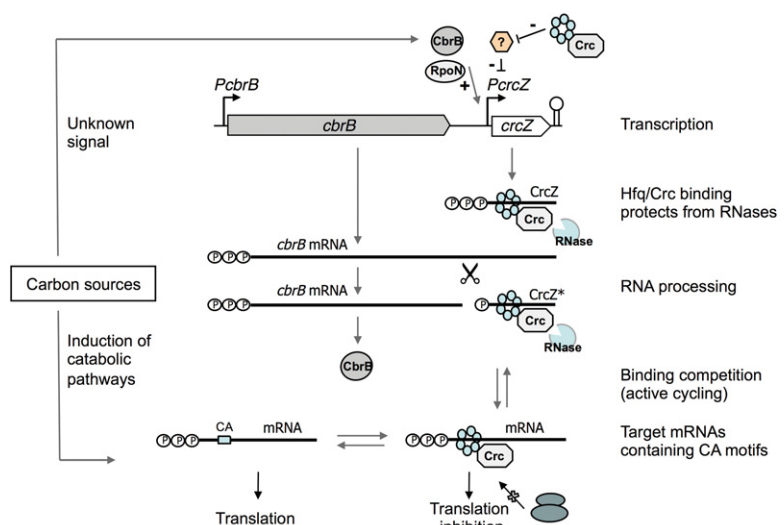


FIGURE 11. Model for the Hfq/Crc/CrcZ regulatory system. See Discussion for details.

mentioned nonpreferred compounds. This suggests that *CrcZ** is functional and can antagonize the inhibitory effect of Hfq/Crc. Additional evidence that modifications at the 5'-end of *CrcZ* do not necessarily impair its ability to counteract Hfq/Crc activity derives from the observation that the individual overproduction of *CrcZ* or *CrcY* variants with 62 extra nt at the 5'-end, using an inducible heterologous promoter, reduces Hfq/Crc-dependent CCR in vivo (Moreno et al. 2012). This suggests that either the unprocessed 62-nt larger variants or their processed derivatives (see Fig. 9) are functional.

Although the amounts of *CrcZ** provided in *trans* to the $\Delta\text{crcZ}\Delta\text{crcY}$ strain could partially complement the hyperrepressing phenotype of this strain, they were not high enough to reduce the repressing effect of the Hfq/Crc proteins on *benA* expression in cells cultured in complete medium, a condition in which the Hfq/Crc-dependent CCR is very strong. In fact, our results show that under the conditions analyzed, *CrcZ** is present at low and constant levels, produced from the weak and constitutive *PcbrB* promoter. On the contrary, the activity of promoter *PcrcZ* varies over an order of magnitude, being highest when cells use a poor carbon source such as oxaloacetate, and lowest when cells grow in a complete medium such as LB (Valentini et al. 2014). Even in LB medium promoter, *PcrcZ* shows some activity and the primary *CrcZ* is present, albeit its amounts are much lower than when *PcrcZ* is fully active (Moreno et al. 2012). The fact that processing of the *cbrB-crcZ* RNA generates a sRNA that is almost identical to *CrcZ*, and the observation that the processed sRNA is functional, suggest that it may play some role in helping *CrcZ* to antagonize Hfq/Crc activity. Since lack of all forms of *CrcZ/CrcY* is very detrimental to the cells, we propose that the processed *CrcZ** sRNA might help in attaining basal levels of *CrcZ/CrcY* that are sufficient to protect the cell from an excessive Hfq/Crc-dependent repression. In addition, *CrcZ** may also help to increase the total output of *CrcZ*, making the *CrcZ*-dependent response faster.

The considerable sequence similarity of *CrcZ* and *CrcY* suggests that *CrcY** is also functional and could participate in controlling Hfq/Crc availability. In conditions that do not require CCR, the amounts of primary *CrcZ* and *CrcY* can increase rapidly by activation of promoters *PcrcZ* and *PcrcY* via the CbrB activator, thereby sequestering the Hfq/Crc proteins.

CrcZ and *CrcY* amounts are very low in *Crc*-null (García-Mauriño et al. 2013) and Hfq-null strains (this study). The use of transcriptional fusions to *lacZ* showed that *Crc* and Hfq have indirect influence on *PcrcZ* and *PcrcY* promoter activity, an effect that could derive from an as yet uncharacterized Hfq/Crc-regulated protein that represses transcription from these promoters (García-Mauriño et al. 2013). Our results nonetheless show that *Crc* and Hfq increase *CrcZ* stability, which adds an additional layer of control that might help to explain why inactivating the *crc* or *hfq* genes greatly reduces *CrcZ* and *CrcY* levels. The observation that *Crc* and Hfq in-

crease *CrcZ* stability supports previous proposals that these proteins form a complex with *CrcZ* (Sonnleitner and Blasi 2014; Madhushani et al. 2015; Moreno et al. 2015). This complex might not only control Hfq/Crc availability, but could also protect *CrcZ* from degradation by RNases. Indeed, Hfq was observed to protect several RNAs from cleavage by RNaseE, consistent with the observation that Hfq can recognize targets very similar to those of RNase E (Møller et al. 2002; Folichon et al. 2003; Massé et al. 2003; Moll et al. 2003; for review, see Saramago et al. 2014). The half-life of *CrcZ*, *CrcY*, and their processed variants is central to determining the levels of these sRNAs in different growth conditions.

Combined with previous evidence, our results indicate that *CrcZ* abundance in *P. putida* is controlled by the complex interaction of several elements that ultimately affect transcription of *crcZ*, as well as the processing and stability of the *crcZ* transcript. Each component affects either the transcription or the stability of other components. The overall process would be similar for *crcY*. This complex autoregulation is summarized in Figure 11.

Since Hfq and *Crc* abundance in *P. putida* does not appear to vary greatly in distinct growth conditions (Moreno et al. 2015), one could predict that *CrcZ/CrcY* would compete with mRNAs bearing appropriate A-rich motives to bind available free Hfq/Crc molecules. Efficient transition from a situation in which Hfq and *Crc* proteins are bound to *CrcZ/CrcY* (no CCR control) to the opposite configuration, in which most Hfq and *Crc* proteins are bound to target mRNAs (strong CCR control), would be determined by the levels of *CrcZ/CrcY* and of target mRNAs. Hfq has high affinity for RNA and dissociates slowly, at least in vitro. To move rapidly among different RNAs, Hfq was proposed to follow an “active cycling” process, sliding from one RNA to another in a manner not limited by the slow dissociation rates, but rather driven by the concentration of free target RNAs (Wagner 2013). In cells growing in a complex medium such as LB, which is a mixture of preferred and nonpreferred carbon sources, *PcrcZ* and *PcrcY* promoter activity is low and *CrcZ* and *CrcY* levels are also comparatively low, such that Hfq/Crc can saturate target mRNAs, inhibiting their translation. The mRNAs that specify proteins needed for the induction, uptake, and assimilation of nonpreferred compounds frequently bear A-rich sites recognized by Hfq (Hernández-Arranz et al. 2013), and Hfq/Crc can therefore inhibit induction of these nonpreferred catabolic pathways. Hfq/Crc binding to these mRNAs would leave *CrcZ/CrcY* insufficiently protected and exposed to degradation by RNases. A decrease in the concentration of preferred compounds would lead to induction of promoters *PcrcZ* and *PcrcY* by the CbrB activator, increasing levels of *CrcZ* and *CrcY*, which also have A-rich sites. The equilibrium would switch toward a situation in which mRNAs containing A-rich sites lose Hfq/Crc, and can therefore be translated, while *CrcZ/CrcY* would bind to these proteins and thus be protected from RNases. The final

configuration of the regulatory system would therefore depend on the relative levels of the target mRNAs and CrcZ/CrcY. The outcome of this complex and multilayered regulation is a rapid response that leads to the hierarchical regulation by available free Hfq/Crc proteins of several uptake and assimilation systems for different carbon sources, thereby organizing the best possible configuration of metabolism, which optimizes growth speed.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, culture media, and plasmids

E. coli and *P. putida* strains were cultured at 37°C and 30°C, respectively. Lysogeny broth (LB; 10 g/L tryptone; 5 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl) was used as complete growth medium. M9 minimal salts medium (Sambrook and Russell 2001) was supplemented with trace elements (Bauchop and Eldsen 1960), and either 30 mM succinate, 30 mM citrate, 30 mM glucose, or 10 mM benzoate as the carbon source. When needed, antibiotics were added at the following concentrations: kanamycin (50 µg/mL), gentamicin (40 µg/mL), streptomycin (50 µg/mL, or 800 µg/mL when the host strain harbored a gentamicin-resistance determinant), ampicillin (100 µg/mL). Cell growth was followed by measuring turbidity at 600 nm.

The *P. putida* strains used were KT2440 (wild type), KT2442 (a spontaneous rifampicin-resistant derivative of strain KT2440 (Franklin et al. 1981), MPO401 (KT2442 *cbrB::km*; García-Mauriño et al. 2013), KT2442*rpoN::Ωkm* (Köhler et al. 1989), KT2440Δ*hfq* (Arce-Rodríguez et al. 2015), KTCRC (KT2440 with a *crc::tet* allele; Hernández-Arranz et al. 2013), KT2440-Z (derives from KT2440 by replacing *crcZ* with an inactivated *crcZ::tet* allele; Moreno et al. 2012), KT2440-ZY (derived from KT2440 and lacks CrcZ and CrcY sRNAs; La Rosa et al. 2015), PBA1 (derived from KT2442; bears a *PbenA::lacZ* transcriptional fusion in the chromosome; Moreno et al. 2012), PBA1C (PBA1 with an inactivated *crc::tet* allele; Moreno et al. 2012), and PBAZY (PBA1 Δ*crcZ*Δ*crcY*; Moreno et al. 2012).

To search for promoters located upstream of promoter *PcrCZ*, a 1.7 kb DNA segment containing promoter *PcbrB*, the complete *cbrB* gene, and downstream sequences to nucleotide 118 downstream from the *cbrB* stop codon (excluding *PcrCZ* sequences and the CbrB binding site upstream of it), were PCR-amplified using oligonucleotides Fw1 and RV7 (Supplemental Table S1). This DNA fragment was cloned between the EcoRI and XbaI sites of plasmid pMP220 to generate a *PcrCZ-cbrB-lacZ* transcriptional fusion; the plasmid obtained was termed pFW1. Similar plasmids were constructed in which this region was progressively deleted from the 5'-end, using oligonucleotides FW2 to FW7 as direct primers for the PCR reaction (Supplemental Table S1) and RV7 as the reverse primer; the constructs were termed pFW2, pFW3, pFW4, pFW5, pFW6, and pFW7.

To generate plasmid p421-Pwt, a DNA region that includes the *cbrB* and *crcZ* genes (including the *PcbrB* promoter) was PCR-amplified from KT2440 chromosomal DNA using the Pfu high-fidelity DNA polymerase (Promega) and oligonucleotides PcbREcoFW1 and CrcZ-XbaI-rv (Supplemental Table S1). The DNA fragment obtained was treated with EcoRI and XbaI and cloned between the EcoRI and XbaI restriction sites of plasmid pSEVA 421 (Martínez-García et al. 2015). Plasmid p421-Pmut is a variant of p421-Pwt

in which the GG and GC nucleotides at the consensus -24 and -12 regions of promoter *PcrCZ* were modified to CC and TT, respectively. To construct it, the appropriate DNA segment was chemically synthesized by GeneArt (Thermo Fisher Scientific) and cloned between the EcoRI and XbaI restriction sites of plasmid pSEVA 421.

Plasmid pPcrCZ (Fonseca et al. 2013), which derives from plasmid pMP220 (Spaink et al. 1987), contains a *PcrCZ-lacZ* transcriptional fusion. Plasmid pPcrCZmut is equivalent to pPcrCZ except that the GG and GC nucleotides at the consensus -24 and -12 regions of promoter *PcrCZ* were modified to CC and TT, respectively. To obtain this plasmid, a DNA segment spanning from the end of *cbrB* to the start site of promoter *PcrCZ* was PCR-amplified from plasmid p421-Pmut with oligonucleotides PcrCZ-EcoRI and PcrCZ-rv-BamHI-2 (See Supplemental Table S1); the amplified fragment was treated with EcoRI and BamHI and cloned between the EcoRI and BamHI sites of the reporter plasmid pMP220, to generate a transcriptional fusion to the *lacZ* indicator gene.

Plasmid p424-Z contains *crcZ* under the influence of the *Ptrc* promoter, and allows overproduction of CrcZ sRNA using IPTG as inducer (Moreno et al. 2012). All plasmid constructs were sequenced and the plasmids transferred to *P. putida* by electroporation.

Total RNA purification from *P. putida*

Cells were grown at 30°C in aerated flasks containing LB medium. At mid-exponential phase ($A_{600} = 0.6$) or at the start of the stationary phase ($A_{600} = 2.2$), samples were collected, harvested by centrifugation, and frozen at -70°C. RNA was purified from cell pellets with the RNeasy RNA purification kit (Qiagen). Purified RNA was treated with RNase-free DNase I (Turbo RNA-free, Ambion). RNA integrity was analyzed by agarose gel electrophoresis. The absence of DNA was confirmed by real-time PCR using primers for *rpoN* or *rpoD* (Morales et al. 2006).

Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR assays were performed using total RNA preparations from three independent cultures (three biological replicas). RNA was reverse-transcribed into cDNA using the cDNA Archive kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed essentially as described previously (Morales et al. 2006), except that the expression profile of each gene was analyzed by absolute quantitation using a standard curve. Standard curves were constructed by serial 10-fold dilutions from 10^7 to 10^3 copies of *P. putida* genomic DNA obtained using the G-NOME DNA purification kit (MP Biomedicals). The primers used are indicated in Supplemental Table S1.

Rapid amplification of cDNA ends (5' RACE)

5' RACE analysis was carried out using the Gene Racer Kit (Life Technologies). Briefly, total RNA obtained as described above was treated with terminator 5'-phosphate-dependent exonuclease (TEX). Reactions were terminated by extraction with phenol and chloroform, followed by ethanol precipitation. RNA samples were resuspended in water and treated with tobacco acid pyrophosphatase (TAP). The GeneRacer RNA oligo was ligated to the RNA 5' end with T4 RNA ligase and samples were transformed to cDNA using random hexamers and SuperScript III reverse transcriptase (Life

Technologies). To amplify the 5' RACE product, a PCR reaction was performed using the GeneRacer 5' primer and the indicated specific reverse primer (Supplemental Table S1). PCR products were then cloned into plasmid pCR4 and transformed into One Shot TOP10 *E. coli* using a TOPO PCR Cloning kit (Life Technologies). The junction (point of ligation) between the sequence corresponding to the RNA oligonucleotide and that of the cDNA 5'-end was determined by DNA sequencing in 14 independent transformants.

Analysis of *CrcZ* 5'-end heterogeneity by primer extension

The oligonucleotide used as primer for the extension reaction, end-labeled with [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase, was *CrcZ*-revPE (Supplemental Table S1). RNA was obtained as indicated above and, where indicated, treated with TEX enzyme, phenolized and precipitated with ethanol. Treated or untreated RNA (15 μ g) were mixed with 4 pmol of the end-labeled primer and heated (80°C, 5 min). The oligonucleotide was allowed to anneal to the RNA by incubation (23°C, 5 min). Primer extension was performed with 200 U SuperScript III (Promega) at 55°C, as indicated by the supplier. The extended cDNA products were analyzed by electrophoresis on a denaturing 6% urea-polyacrylamide gel, in parallel with a DNA sequence ladder obtained by chemical sequencing (Maxam and Gilbert 1980) of a DNA fragment obtained by PCR. The gel was dried, exposed to a phosphorimager screen and visualized using the Personal Molecular Imager (Bio-Rad).

Assay for β -galactosidase

An overnight culture of the strain of interest was diluted to a final turbidity (A_{600}) of 0.05 in fresh LB medium. Where indicated, 1 mM IPTG or 5 mM benzoate were added to induce transcription from promoters *P_{trc}* or *P_{benA}*, respectively. Cells were allowed to grow at 30°C with vigorous aeration; aliquots were taken at various time points; and β -galactosidase activity was measured using as substrate *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside (Miller 1972). Three independent assays were performed.

Northern blots

To generate an RNA probe against *CrcZ*, a 150-bp DNA segment spanning the central region of *CrcZ* (the least similar to *CrcY*) was PCR amplified using primers *CrcZ*-HindIII-fw and *CrcZ*-EcoRI-rv (see Supplemental Table S1), which include restriction sites for endonucleases HindIII and EcoRI, respectively. The resulting DNA fragment was cloned between the HindIII and EcoRI sites of plasmid pSPT18 (Roche) to obtain pSPT18-Z. The plasmid was HindIII linearized and used as template for an in vitro transcription reaction in which the central region of *crcZ* was transcribed from the T7 promoter of the vector. Transcription was performed using the DIG RNA labelling kit (Roche) and T7 RNA polymerase. To generate a probe against the 5S ribosomal RNA, a DNA fragment corresponding to the gene specifying the 5S RNA was PCR amplified using primers 5S-HindIII-fw and 5S-EcoRI-rv (Supplemental Table S1), and the resulting DNA fragment was cloned between the HindIII and EcoRI sites of plasmid pSPT18 to generate plasmid pSPT18-5S. This plasmid was linearized with HindIII and used as

template for an in vitro transcription reaction with T7 RNA polymerase, as indicated above.

For Northern blots, 5 μ g total RNA purified from the indicated strain, and 60 ng of RNA Molecular Weight Marker III DIG-labelled (Roche), were resolved by electrophoresis on a 6% polyacrylamide gel containing 7 M urea and transferred to a Nylon Hybond N+ membrane (GE Healthcare Biosciences) with a semi-dry transfer unit (Trans-blot SD, Bio-Rad; 400 mA, 1 h). Membranes were UV-cross-linked and hybridized with a mixture of DIG-labeled probes against *CrcZ* and 5S (20 ng each). Bands that hybridized to the probes were detected using the DIG Luminescent Detection Kit (Roche), and signals were visualized by exposure to Agfa X-ray film. A digoxigenin-labeled RNA molecular weight marker (Roche) was used as a size marker.

Where indicated, the RNA was treated with TEX (terminator 5'-phosphate-dependent exonuclease, Epicentre) prior to Northern analyses. Briefly, 5 μ g total RNA were incubated with 1 U of TEX (1 h, 30°C) and the reaction terminated by adding 1 μ L of 100 mM EDTA (pH 8). Formamide buffer was added and the reaction was loaded into the 6% polyacrylamide 7 M urea gel.

Determination of *CrcZ* sRNA stability

P. putida strains KT2440-Z, KTCRC, and KT2440 Δ *hfq* containing plasmid p424-Z were cultured at 30°C in LB medium supplemented with streptomycin. To induce *CrcZ* synthesis, IPTG was added to a final concentration of 1 mM. When cultures reached a turbidity of 0.6 (A_{600}), 0.3 mg/mL rifampicin was added; 10 mL aliquots were withdrawn at 0, 2, 4, 8, 16, and 32 min and mixed with two volumes of RNeasy Protect Reagent (Qiagen). Total RNA was isolated as above and 10 μ g of the RNA obtained were resolved on a 6% polyacrylamide/7 M urea gel. The RNA bands were transferred to a nylon Hybond N+ membrane and detected by Northern blot as above. Band intensities were quantified using a ChemiDoc XRS imager and *Image Lab* software (Bio-Rad). The value obtained for *CrcZ* in each sample was normalized to that of the 5S rRNA of the same sample.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available for this article.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to V. de Lorenzo and I. Canosa for providing *P. putida* strains with inactivated *hfq* or *cbrB* genes, and to C. Mark for editorial assistance. S.H.-A. and D.S.-H. received predoctoral fellowships from the Spanish Ministry of Science and Competitiveness (MINECO). Work was supported by grants BFU2012-32797 (MINECO, Spain) and BIO2015-66203-P (MINECO/FEDER).

Received July 14, 2016; accepted October 2, 2016.

REFERENCES

- Amador CI. 2011. "Characterization of the regulatory role of CbrB in *Pseudomonas putida*." PhD thesis, Pablo de Olavide University, Seville, Spain.

- Arce-Rodriguez A, Calles B, Nikel PI, de Lorenzo V. 2015. The RNA chaperone Hfq enables the environmental stress tolerance super-phenotype of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* doi: 10.1111/1462-2920.13052.
- Bauchop T, Eldsen SR. 1960. The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *J Gen Microbiol* **23**: 457–469.
- Bobrovskyy M, Vanderpool CK. 2013. Regulation of bacterial metabolism by small RNAs using diverse mechanisms. *Annu Rev Genet* **47**: 209–232.
- Davis BM, Waldor MK. 2007. RNase E-dependent processing stabilizes MicX, a *Vibrio cholerae* sRNA. *Mol Microbiol* **65**: 373–385.
- De Lay N, Schu DJ, Gottesman S. 2013. Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices. *J Biol Chem* **288**: 7996–8003.
- Filiatrault MJ, Stodghill PV, Wilson J, Butcher BG, Chen H, Myers CR, Cartinhour SW. 2013. CrcZ and CrcX regulate carbon source utilization in *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strain DC3000. *RNA Biol* **10**: 245–255.
- Folichon M, Arluisson V, Pellegrini O, Huntzinger E, Regnier P, Hajnsdorf E. 2003. The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation. *Nucleic Acids Res* **31**: 7302–7310.
- Fonseca P, Moreno R, Rojo F. 2013. *Pseudomonas putida* growing at low temperature shows increased levels of CrcZ and CrcY sRNAs, leading to reduced Crc-dependent catabolite repression. *Environ Microbiol* **15**: 24–35.
- Franklin FC, Bagdasarian M, Bagdasarian MM, Timmis KN. 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc Natl Acad Sci* **78**: 7458–7462.
- Frohlich KS, Vogel J. 2009. Activation of gene expression by small RNA. *Curr Opin Microbiol* **12**: 674–682.
- García-Mauriño SM, Pérez-Martínez I, Amador CI, Canosa I, Santero E. 2013. Transcriptional activation of the CrcZ and CrcY regulatory RNAs by the CbrB response regulator in *Pseudomonas putida*. *Mol Microbiol* **89**: 189–205.
- Gómez-Lozano M, Marvig RL, Molina-Santiago C, Tribelli PM, Ramos JL, Molin S. 2015. Diversity of small RNAs expressed in *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol Rep* **7**: 227–236.
- Gopel Y, Khan MA, Gorke B. 2016. Domain swapping between homologous bacterial small RNAs dissects processing and Hfq binding determinants and uncovers an aptamer for conditional RNase E cleavage. *Nucleic Acids Res* **44**: 824–837.
- Hernández-Arranz S, Moreno R, Rojo F. 2013. The translational repressor Crc controls the *Pseudomonas putida* benzoate and alkane catabolic pathways using a multi-tier regulation strategy. *Environ Microbiol* **15**: 227–241.
- Köhler T, Harayama S, Ramos JL, Timmis KN. 1989. Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN σ factor in regulation of various metabolic functions. *J Bacteriol* **171**: 4326–4333.
- La Rosa R, Nogales J, Rojo F. 2015. The Crc/CrcZ-CrcY global regulatory system helps the integration of gluconeogenic and glycolytic metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **17**: 3362–3378.
- Madhushani A, Del Peso-Santos T, Moreno R, Rojo F, Shingler V. 2015. Transcriptional and translational control through the 5'-leader region of the *dmpR* master regulatory gene of phenol metabolism. *Environ Microbiol* **17**: 119–133.
- Mandin P, Guillier M. 2013. Expanding control in bacteria: interplay between small RNAs and transcriptional regulators to control gene expression. *Curr Opin Microbiol* **16**: 125–132.
- Martínez-García E, Aparicio T, Goñi-Moreno A, Fraile S, de Lorenzo V. 2015. SEVA 2.0: an update of the Standard European Vector Architecture for de-/re-construction of bacterial functionalities. *Nucleic Acids Res* **43**: D1183–D1189.
- Massé E, Escorcia FE, Gottesman S. 2003. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **17**: 2374–2383.
- Maxam AM, Gilbert W. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol* **65**: 499–560.
- Miller JH. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Miyakoshi M, Chao Y, Vogel J. 2015. Regulatory small RNAs from the 3' regions of bacterial mRNAs. *Curr Opin Microbiol* **24**: 132–139.
- Moll I, Afonyushkin T, Vytvytska O, Kaberdin VR, Blasi U. 2003. Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA* **9**: 1308–1314.
- Møller T, Franch T, Hojrup P, Keene DR, Bachinger HP, Brennan RG, Valentin-Hansen P. 2002. Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell* **9**: 23–30.
- Morales G, Linares JF, Beloso A, Albar JP, Martínez JL, Rojo F. 2004. The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *J Bacteriol* **186**: 1337–1344.
- Morales G, Ugidos A, Rojo F. 2006. Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome *o* ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and *ccb3-1* terminal oxidases. *Environ Microbiol* **8**: 1764–1774.
- Moreno R, Rojo F. 2008. The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator. *J Bacteriol* **190**: 1539–1545.
- Moreno R, Rojo F. 2014. Features of pseudomonads growing at low temperatures: another facet of their versatility. *Environ Microbiol Rep* **6**: 417–426.
- Moreno R, Marzi S, Romby P, Rojo F. 2009. The Crc global regulator binds to an unpaired A-rich motif at the *Pseudomonas putida* *alkS* mRNA coding sequence and inhibits translation initiation. *Nucleic Acids Res* **37**: 7678–7690.
- Moreno R, Fonseca P, Rojo F. 2012. Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression. *Mol Microbiol* **83**: 24–40.
- Moreno R, Hernández-Arranz S, La Rosa R, Yuste L, Madhushani A, Shingler V, Rojo F. 2015. The Crc and Hfq proteins of *Pseudomonas putida* cooperate in catabolite repression and formation of ribonucleic acid complexes with specific target motifs. *Environ Microbiol* **17**: 105–118.
- Nikel PI, Martínez-García E, de Lorenzo V. 2014. Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. *Nat Rev Microbiol* **12**: 368–379.
- Poblete-Castro I, Becker J, Dohnt K, Dos Santos VM, Wittmann C. 2012. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**: 2279–2290.
- Romby P, Vandenesch F, Wagner EG. 2006. The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression. *Curr Opin Microbiol* **9**: 229–236.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saramago M, Bárria C, Dos Santos RF, Silva IJ, Pobre V, Domingues S, Andrade JM, Viegas SC, Arraiano CM. 2014. The role of RNases in the regulation of small RNAs. *Curr Opin Microbiol* **18**: 105–115.
- Sharma CM, Storz G. 2011. Interesting twists on small RNA themes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **80**: 855–859.
- Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, Jackson RW. 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 652–680.
- Sobrero P, Valverde C. 2012. The bacterial protein Hfq: much more than a mere RNA-binding factor. *Crit Rev Microbiol* **38**: 276–299.
- Sonnleitner E, Blasi U. 2014. Regulation of Hfq by the RNA CrcZ in *Pseudomonas aeruginosa* carbon catabolite repression. *PLoS Genet* **10**: e1004440.
- Sonnleitner E, Haas D. 2011. Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**: 63–79.
- Sonnleitner E, Schuster M, Sorger-Domenigg T, Greenberg EP, Bläsi U. 2006. Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **59**: 1542–1558.

- Sonnleitner E, Abdou L, Haas D. 2009. Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 21866–21871.
- Spaink HP, Okker RJ, Wijffelman CA, Pees E, Lugtenberg BJ. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. *Plant Mol Biol* **9**: 27–39.
- Storz G, Vogel J, Wassarman KM. 2011. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell* **43**: 880–891.
- Valentini M, García-Mauriño SM, Pérez-Martínez I, Santero E, Canosa I, Lapouge K. 2014. Hierarchical management of carbon sources is regulated similarly by the CbrA/B systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Microbiology* **160**: 2243–2252.
- Vogel J, Luisi BF. 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* **9**: 578–589.
- Wagner EG. 2013. Cycling of RNAs on Hfq. *RNA Biol* **10**: 619–626.
- Wagner EG, Romby P. 2015. Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it. *Adv Genet* **90**: 133–208.
- Wassarman KM. 2002. Small RNAs in bacteria: diverse regulators of gene expression in response to environmental changes. *Cell* **109**: 141–144.
- Waters LS, Storz G. 2009. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**: 615–628.
- Wu X, Monchy S, Taghavi S, Zhu W, Ramos J, van der Lelie D. 2011. Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 299–323.



RNA

A PUBLICATION OF THE RNA SOCIETY

Effect of Crc and Hfq proteins on the transcription, processing, and stability of the *Pseudomonas putida* CrcZ sRNA

Sofía Hernández-Arranz, Dione Sánchez-Hevia, Fernando Rojo, et al.

RNA 2016 22: 1902-1917 originally published online October 24, 2016

Access the most recent version at doi:[10.1261/rna.058313.116](https://doi.org/10.1261/rna.058313.116)

Supplemental Material

<http://rnajournal.cshlp.org/content/suppl/2016/10/24/rna.058313.116.DC1>

References

This article cites 51 articles, 8 of which can be accessed free at:
<http://rnajournal.cshlp.org/content/22/12/1902.full.html#ref-list-1>

Creative Commons License

This article is distributed exclusively by the RNA Society for the first 12 months after the full-issue publication date (see <http://rnajournal.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml>). After 12 months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

Email Alerting Service

Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or [click here](#).

To subscribe to *RNA* go to:
<http://rnajournal.cshlp.org/subscriptions>

Influence of the Hfq and Crc global regulators on the control of iron homeostasis in *Pseudomonas putida*

Journal:	<i>Environmental Microbiology and Environmental Microbiology Reports</i>
Manuscript ID	Draft
Journal:	Environmental Microbiology
Manuscript Type:	EMI - Research article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Sánchez-Hevia, Dione; Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Biotecnología Microbiana Yuste, Luis; Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Biotecnología Microbiana Moreno, Renata; Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Biotecnología Microbiana Rojo, Fernando; Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Biotecnología Microbiana;
Keywords:	bacteria, gene expression/regulation, genomics/functional genomics/comparative genomics, metabolic networks, metals

**Influence of the Hfq and Crc global regulators on the control of
iron homeostasis in *Pseudomonas putida***

Dione L. Sánchez-Hevia, Luis Yuste, Renata Moreno* and Fernando Rojo*

Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC,
Darwin 3, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

***E-mail of Corresponding authors:** frojo@cnb.csic.es; rmoreno@cnb.csic.es

E-mail of co-authors: dlsanchez@cnb.csic.es; lyuste@cnb.csic.es

Tel: (+34) 91 585 45 39; **Fax:** (+34) 91 585 45 06

Running title: Hfq and Crc influence on iron homeostasis

Key words: Translational regulation, Global regulation, Catabolite repression, Carbon
metabolism, iron metabolism, RNA binding

SUMMARY

Metabolically versatile bacteria use catabolite repression control to select their preferred carbon sources, thus optimizing carbon metabolism. In pseudomonads, this occurs through the combined action of the proteins Hfq and Crc, which form stable tripartite complexes at target mRNAs, inhibiting their translation. The activity of Hfq/Crc is antagonised by small RNAs of the CrcZ family, the amounts of which vary according to carbon availability. The present work examines the role of *Pseudomonas putida* Hfq protein under conditions of low-level catabolite repression, in which Crc protein would have a minor role since it is sequestered by CrcZ/CrcY. The results suggest that, under these conditions, Hfq remains operative and plays an important role in iron homeostasis. In this scenario, Crc appears to participate indirectly by helping CrcZ/CrcY to control the amount of free Hfq in the cell. Iron homeostasis in pseudomonads relies on regulatory elements such as the Fur protein, the PrrF1-F2 sRNAs, and several extracytoplasmic sigma factors. Our results show that the absence of Hfq is paralleled by a reduction in PrrF1-F2 small RNAs. Hfq thus provides a regulatory link between iron and carbon metabolism, coordinating the iron supply to meet the needs of the enzymes operational under particular nutritional regimes.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

Originality-Significance Statement

The Hfq protein is a riboregulator present in many bacterial groups; it controls mRNA translation by facilitating the annealing between sRNAs and their target mRNAs, or by forming complexes at the translation initiation regions of mRNAs. It can influence the stability of many small RNAs. In pseudomonads, Hfq, together with the regulatory protein Crc, helps to optimize carbon metabolism via the so-called catabolite repression response. Hfq and Crc form tripartite ribonucleoprotein complexes at specific target sites, inhibiting the initiation of translation of affected mRNAs. The activity of Crc/Hfq is antagonised by small RNAs of the CrcZ family, the amounts of which vary strongly according to carbon availability. In *Pseudomonas aeruginosa*, Hfq also influences virulence and quorum sensing. The present work examines the role of *Pseudomonas putida* Hfq protein under conditions of low-level catabolite repression control, under which Crc protein is believed to play a minor role. The results support the idea that, under conditions in which most Crc molecules are likely sequestered by CrcZ and CrcY, Hfq still performs important regulatory functions, implying that a significant amount of free Hfq must remain. Indeed, the present work shows that Hfq participates in the orchestration of iron homeostasis, at least in part by controlling the levels of PrrF1 and PrrF2 sRNAs. Crc appears to have an indirect role in controlling the amount of free Hfq, perhaps by facilitating the formation of stable Crc-Hfq-CrcZ/CrcY complexes.

1 Introduction

2 *Pseudomonas putida*, a Gram-negative bacterium, can colonize different environments
 3 such as soils, the rhizosphere, and aquatic systems (Wu et al., 2011; Udaondo et al.,
 4 2016). This is in part due to its capacity to endure many kinds of stress (Martínez-García
 5 and de Lorenzo, 2011; Moreno and Rojo, 2014; Ramos et al., 2015), but also to its ability
 6 to exploit a wide range of carbon sources (Nelson et al., 2002; Belda et al., 2016). These
 7 properties, plus its non-pathogenic status, render *P. putida* an interesting model organism
 8 of great potential in industrial biotechnology (Poblete-Castro et al., 2012; Nikel et al.,
 9 2014). Key to its metabolic versatility is its efficient control of the uptake and metabolism of
 10 nutrients, allowing cells to assimilate many of them in a hierarchical and sequential order;
 11 its metabolism is adjusted to each situation, optimizing energy gains (Shingler, 2003; Rojo,
 12 2010). The global regulatory system instrumental in organizing the most appropriate
 13 metabolic configuration relies on the combined action of the proteins Hfq and Crc, the
 14 CrcZ and CrcY small RNAs (sRNAs), and the CbrA/CbrB two-component system.

15 Hfq is a small and abundant RNA-binding protein present in most bacterial species; it
 16 recognizes specific targets in RNAs and has a key role in post-transcriptional gene
 17 regulation. In *Escherichia coli*, and probably many other bacterial species, Hfq facilitates
 18 the annealing of sRNAs to their target mRNAs, ultimately modulating their translation and
 19 stability (for reviews see Vogel and Luisi, 2011; Wagner and Romby, 2015; Updegrove et
 20 al., 2016). In pseudomonads, the inactivation of the *hfq* gene results in a general reduction
 21 in physiological performance. In *P. putida*, a lack of Hfq has consequences on cell
 22 morphology, growth on a number of carbon sources, cell motility, and the regulation of the
 23 stress-related σ^S sigma factor. In addition, Hfq-deficient cells have lower ATP and NADPH
 24 contents and are more sensitive to oxidative stress and UV light (Arce-Rodríguez et al.,
 25 2016). Inactivation of the *hfq* gene in *P. aeruginosa* also results in pleiotropic effects that
 26 influence cell motility and growth under anoxic conditions, as well as causing redox
 27 imbalances, altered quorum-sensing responses, and significantly attenuated virulence

1 (Sonnleitner et al., 2003; Sonnleitner et al., 2006; Pusic et al., 2016). In pseudomonads,
2 Hfq assists the annealing of regulatory sRNAs to their target mRNAs (Ferrara et al., 2015),
3 but part of its regulatory function is performed in cooperation with the Crc (catabolite
4 repression control) protein, which has been found only in this bacterial group and certain
5 related genera (reviewed in Rojo, 2010; see also Quiroz-Rocha et al., 2017). Crc is a
6 global regulator that modulates the expression of many genes, helping to control carbon
7 metabolism. It acts post-transcriptionally, inhibiting the translation of mRNAs containing an
8 AAnAAnAA motif close to the ribosome binding site. This motif is initially recognized by
9 Hfq, the role of Crc being to stabilize Hfq-binding as a tripartite Hfq-RNA-Crc complex
10 (Moreno et al., 2009b; Sonnleitner et al., 2009; Madhushani et al., 2015; Moreno et al.,
11 2015; Sonnleitner et al., 2017).

12 The activity of Hfq and Crc is antagonized by the CrcZ and CrcY sRNAs. These
13 sRNAs are very similar to one another in sequence and contain several A-rich Hfq target
14 motifs believed to bind and sequester Hfq and Crc to form a Crc-Hfq-CrcZ/Y complex
15 (Sonnleitner et al., 2009; Moreno et al., 2012; Sonnleitner and Blasi, 2014; Madhushani et
16 al., 2015; Moreno et al., 2015; Hernández-Arranz et al., 2016). The levels of these two
17 sRNAs vary greatly depending on growth and/or physiological conditions, being lower
18 when cells use rich carbon sources that allow for rapid growth, and much higher when
19 non-preferred carbon sources are used (Valentini et al., 2014, and references cited
20 above). This presumably allows Hfq/Crc activity to be adapted to cell needs, with
21 metabolism adjusted accordingly. The amount of CrcZ and CrcY in the cell depends on an
22 equilibrium between their transcription from promoters *PcrcZ* and *PcrcY* respectively, and
23 their degradation. These promoters are recognized by a form of RNA polymerase bound to
24 the RpoN sigma factor and require the CbrB transcriptional activator. CbrB is
25 phosphorylated by CbrA sensor kinase in response to a still unknown signal (Sonnleitner
26 et al., 2009; Moreno et al., 2012; García-Mauriño et al., 2013). The binding of Hfq and Crc
27 to CrcZ and CrcY protects them from degradation by RNases (Hernández-Arranz et al.,
28 2016).

1 The inactivation of the *crc* gene in *P. putida* and *P. aeruginosa* results in phenotypes
2 characterized by an unbalanced metabolism, an altered hierarchy of the uptake and
3 assimilation of carbon sources, increased antibiotic susceptibility, and reduced fitness
4 (MacGregor et al., 1992; Moreno et al., 2009a; Linares et al., 2010; Hernández-Arranz et
5 al., 2013; La Rosa et al., 2014; La Rosa et al., 2015). These phenotypes have also been
6 observed for an Hfq-null strain, although *hfq* inactivation has a much more severe effect
7 than the inactivation of *crc*. Since many of the Hfq-dependent phenotypes are not seen in
8 Crc-null strains, but Crc needs Hfq to exert its functioning, it would seem that Hfq can
9 regulate some genes on its own but needs Crc to control a specific subset of genes.

10 The aim of the present work was to identify the genes regulated by Hfq but not by
11 Crc, and to determine the possible function of Hfq and Crc when cells grow using just one
12 carbon source. This was undertaken by comparing the transcriptome and proteome of Crc-
13 null, Hfq-null and Crc/Hfq-null strains to those of the wild type strain. Cells were cultured in
14 a mineral salts medium containing succinate as the carbon source. This was used for
15 several reasons. First, the growth rate of the Crc-null and the Hfq-null strains in this
16 medium is similar, which facilitates comparison. And second, when *P. putida* grows at the
17 expense of succinate as the sole carbon source, the levels of CrcZ and CrcY are relatively
18 high, and a large proportion of the Hfq/Crc molecules would therefore be sequestered by
19 these sRNAs (La Rosa et al., 2015). This agrees with *P. putida* showing only a moderate
20 preference for succinate as a carbon source (Yuste et al., 1998; Hester et al., 2000; La
21 Rosa et al., 2015; reviewed in Rojo, 2010). Under these conditions, Crc should be mostly
22 non-functional, while Hfq ought to remain present at sufficient levels to perform its Crc-
23 independent regulatory functions. The results obtained show that, when cells use
24 succinate as the sole carbon source, Hfq still regulates genes that are, for the most part,
25 unrelated to carbon catabolism. Indeed, Hfq was found to have an important role in
26 controlling iron metabolism. This supports the idea that the CrcZ/Y present in cells growing
27 on succinate sequester most of the Crc molecules available, but enough Hfq remains to

control other genes through mechanisms that rely on other sRNAs, such as those involved in iron homeostasis.

Results and Discussion

Inactivation of the crc or hfq genes modifies the expression of a significant number of genes under the conditions analysed: general view

Earlier work has shown that, although Crc and Hfq are post-transcriptional regulators, their absence has an important influence on the transcriptome since they inhibit the translation of mRNAs for several transcriptional regulators as well as for proteins involved in the uptake of substrates which in turn induce the expression of catabolic pathways (Sonnleitner et al., 2006; Moreno et al., 2009a; Hernández-Arranz et al., 2013; Grenga et al., 2017). To gain initial insight into the influence of Hfq and Crc in cells growing in a minimal salts medium containing succinate as the sole carbon source, the transcriptomic profile of wild-type *P. putida* KT2440 was compared to that of its *hfq*, *crc* and *hfq crc* mutant derivatives. Total RNA was obtained from exponentially growing cells ($A_{600}=0.6$) and the transcriptomes analysed by directional RNA-seq deep sequencing. RNAs levels more than 3-fold (\log_2 of 1.58) different between the two strains, and for which the false discovery rate (FDR) was ≤ 0.01 , were considered differentially expressed. With these cut-off values, the inactivation of *crc* led to changes in the mRNA abundance of 82 genes, while the lack of *hfq* affected 179 genes (Supplementary Tables S1 and S2). The inactivation of both *crc* and *hfq* modified the mRNA levels of 301 genes (Table S3).

When comparing the transcriptomes of the mutant strains to that of the wild type, most of the differentially expressed genes corresponded to either hypothetical proteins or proteins with an unknown function, or to those involved in the binding and transport of substrates, regulatory functions, or energy metabolism (Figure S1). In the Crc-null strain, most of the genes affected had lower mRNA levels than the wild type strain; this was less pronounced in the Hfq-null strain.

1 Unexpectedly, the transcriptome of the Hfq-null strain showed no RNA reads for the
2 region spanning genes PP_3849 to PP_3920, except for gene PP_3868. This region
3 corresponds to prophage 1, one of the four prophages identified in this bacterial strain (Wu
4 et al., 2011; Martínez-García et al., 2015b). PCR amplification using primers specific for
5 the genes located at one of the ends of the non-expressed phage genes (direct primer
6 hybridizing at PP_3849, and inverse primer at PP_3850) rendered a clear amplification
7 signal when using chromosomal DNA from the wild type strain, but not when using DNA
8 from the Hfq-null strain (Figure S2). A similar result was obtained when using a primer pair
9 directed towards the genes of the other end of prophage 1 (genes PP_3919 and
10 PP_3920). This shows that prophage 1 is not present in the Hfq-null strain. The reads
11 assigned to gene PP_3868, which is located in the central region of the prophage and
12 codes for a protein with similarity to group II intron-encoding maturases, likely correspond
13 to any of the seven other genes present in the KT2440 genome that show >97%
14 nucleotide similarity to PP_3868; these reads were most likely incorrectly assigned to
15 PP_3868 by the software. In summary, prophage 1 was concluded absent in the Hfq-null
16 strain.

17 Although the RNA levels of some genes corresponding to prophages 2 and 3 were
18 higher in the Hfq-null strain than in the wild type, the changes observed did not pass the
19 filters set to consider a gene as differentially expressed. However, 11 of the 52 genes
20 conforming prophage 4 (PP_1532 to PP_1584) were clearly overexpressed in the Hfq-null
21 strain (Table S2). The altered expression of prophage 4 in the Hfq-null strain, as well as
22 the absence of prophage 1, suggest that Hfq might affect the regulation of the
23 lysis/lysogeny decision, either directly or as a consequence of the metabolic stress known
24 to occur in this mutant strain (Martínez-García et al., 2015b).

25 Since Hfq and Crc are post-transcriptional regulators, the effect of their absence on
26 the proteome was also analysed in cells cultured under the same conditions used in the
27 RNA-seq assays. Proteins were analysed using the iTRAQ procedure (see Experimental
28 Procedures); only those proteins identified with $FDR \leq 0.01$ were taken into consideration.

1 The relative levels of 1418 proteins for the *Crc*-null strain, of 1419 for the *Hfq*-null strain,
2 and of 1410 for the *crc hfq* double mutant, were compared to those of the wild type strain.
3 Proteins with a ≥ 1.4 fold (\log_2 of 0.49) change in abundance, and with a *q*-value of ≤ 0.05 ,
4 were considered differentially expressed. Table S3 summarizes the results obtained. The
5 expression of 10 proteins was altered in the *crc* mutant compared to the wild-type strain. In
6 the *hfq* mutant, the levels of 54 proteins were affected. In the double mutant, 81 proteins
7 were differentially expressed. Fifteen of the differentially expressed proteins correspond to
8 mRNAs containing a putative A-rich Hfq binding site at their 5' end (Table S3). This
9 included proteins involved in the uptake and assimilation of amino acids (HmgA, AatJ or
10 BkdA1) or sugars (Gap-1), the expression of which is known to be regulated by Hfq/Crc
11 (Hester et al., 2000; Morales et al., 2004; Moreno et al., 2009a). Interestingly, many
12 proteins differentially expressed in the iTRAQ assays showed no detectable changes in
13 the RNA-seq assays, which is suggestive of post-transcriptional regulation (for 9 genes in
14 the *crc* mutant strain, 46 in the *hfq* mutant strain, and 61 in the double mutant; Table S3).

16 *Effect of inactivating the crc gene on the transcriptome and proteome of the cell*

17 Both the transcriptomic and proteomic assays indicated that, in the minimal medium
18 with succinate used to culture the cells, the absence of Crc had a significantly smaller
19 influence than that observed in earlier reports in which cells had been cultured in LB
20 complete medium (Moreno et al., 2009a). This is consistent with the observation that the
21 amount of CrcZ+CrcY present in cells growing exponentially in M9 medium with succinate
22 is more than 7 fold that seen in cells cultured in LB medium (La Rosa et al., 2015). This
23 suggests that when cells grow in M9 succinate medium there is less Crc and/or Hfq
24 available to control gene expression than in LB medium. In addition, a large proportion of
25 the genes actively regulated by Crc/Hfq in cells cultured in LB were not induced in the
26 succinate medium, or expressed at very low levels, as might be expected for a metabolism
27 in which succinate is the sole carbon source.

1 It is worth noting, however, that many of the genes for which expression changed
 2 when *Crc* was lacking appeared not to be influenced by the absence of Hfq. Only 30 out of
 3 the 179 genes regulated by Hfq also showed a change in the *Crc*-null strain (Fig. 1). At
 4 first glance this is surprising since, if *Crc* strictly needs Hfq to exert its regulatory function
 5 (as is believed), it might be argued that all genes that are differentially expressed by the
 6 absence of *Crc* should also show altered expression in the Hfq-null strain. However, it
 7 should be taken into account that with the M9 succinate medium used, the amount of Hfq
 8 and *Crc* trapped by *CrcZ/CrcY* is very great, and if *Crc* is absent, the complexes formed by
 9 Hfq with these two sRNAs would be unstable (Moreno et al., 2015; Sonnleitner et al.,
 10 2017). In addition, inactivation of the *crc* gene leads to a strong decrease in *CrcZ* and
 11 *CrcY* levels (García-Mauriño et al., 2013; Hernández-Arranz et al., 2016). Thus, the *Crc*-
 12 null strain would have significantly larger amounts of free Hfq protein than the wild type
 13 strain. Since Hfq can regulate genes in a *Crc*-independent manner, for example by
 14 facilitating the annealing of sRNAs to target mRNAs, the larger amounts of free Hfq
 15 present in the *Crc*-null strain might impact the expression of several genes that would
 16 otherwise not be regulated by Hfq in the wild type strain. An alternative explanation for the
 17 existence of genes deregulated in the *Crc*-null strain, but not in the Hfq-null strain, is that
 18 *Crc* might also exert a regulatory function with the aid of a protein other than Hfq. Although
 19 there is currently no direct evidence for this, it would help explain the unexpected
 20 observation that the number of differentially expressed genes in the double mutant (301
 21 genes in the RNA-seq assays) was greater than that seen in the Hfq-null strain (179
 22 genes). If *Crc* strictly needs Hfq for RNA binding, the number of genes affected in the Hfq-
 23 null strain ought to be similar to that of the double mutant.

24 The changes in RNA levels detected in the *Crc*-null strain were, in most cases,
 25 small, and the affected genes generally not grouped into operons (Table S1). The possible
 26 differential expression of 16 of these genes was also analysed by real-time RT-PCR,
 27 which in only 10 cases revealed a change of greater than 2-fold (Table S5). The proteomic
 28 assays detected changes in only 10 proteins, half of them ribosomal. This agrees with *Crc*

1 playing a minor role under the conditions tested. It is worth noting, however, that the RNA
2 levels for 16 genes involved in iron homeostasis showed a clear reduction in the Crc-null
3 strain (Fig 2B). This was confirmed by real-time RT-PCR in the three cases tested,
4 although the fold-change values recorded were lower than those seen in the RNA-seq
5 assays (Table S5). Since the expression of all these genes was also affected by the
6 absence of Hfq, these results are discussed below with those for the latter protein.

7 Among the genes for which RNA levels increased in the absence of Crc were those
8 for the high affinity transport system for succinate and fumarate, *dctPQM*. The expression
9 of these genes is known to be repressed post-transcriptionally by Crc in both *P. putida* (La
10 Rosa et al., 2015) and *P. aeruginosa* (Valentini and Lapouge, 2013). In fact, both *P. putida*
11 *dctP* and *dctM* contain clear Hfq/Crc binding sites at their translation initiation regions. With
12 the filters used here, only *dctM* appeared to be regulated by Crc (RNA levels were three
13 times those recorded for the Crc-null strain; $P < 0.008$), although less restrictive filtering
14 showed *dctP* and *dctQ* mRNA levels to be somewhat higher in the Crc-null strain (1.9-fold,
15 for *dctP*, and 1.8-fold, for *dctQ*). The DctPQM transport system plays a major role at
16 micromolar concentrations of succinate, although at the millimolar concentrations used
17 here, succinate uptake also occurs through the DctA transporter, the expression of which
18 is not repressed but rather stimulated indirectly by Crc in *P. aeruginosa* (Valentini and
19 Lapouge, 2013). In *P. putida*, the expression of *dctA* appears to be independent of Crc (La
20 Rosa et al., 2015; this work).

22 *Effect of inactivating the hfq gene on the transcriptome and proteome: iron homeostasis*

23 Of the 179 genes for which mRNA levels were altered in the Hfq-null strain, 77
24 corresponded to prophages, hypothetical proteins, or genes of unknown function. Among
25 the remaining 102 genes, 41 were related to iron metabolism, 21 were involved in the
26 transport and metabolism of amino acids, acetoin or other compounds, 13 corresponded to

different components of the electron transport chain, 6 were related to cellular stress, while the rest were associated to diverse functions.

Expression of the genes corresponding to the terminal oxidases Cbb3-1 and Aa3 of the electron transport chain all showed reduced expression in the Hfq-null strain. *P. putida* has a branched electron transport chain with multiple terminal oxidases, the relative proportion of which vary according to environmental and physiological conditions (Ugidos et al., 2008; Sevilla et al., 2013). The altered expression of Cbb3-1 and Aa3 terminal oxidases is therefore likely related to an adjustment in the configuration of the electron transport chain to meet the energy demands of the mutant strain. In the light of the general effects on the cell caused by the lack of Hfq, some adjustments in metabolism might be expected. This would explain the altered expression of the genes corresponding to porins and the catabolism of acetoin and amino acids. However, the large number of genes involved in iron homeostasis that showed an altered expression in the strain lacking Hfq indicates that this protein plays an important role in iron metabolism. This was analysed in further detail.

Iron acts as an essential cofactor for many enzymes involved in carbon assimilation and energy metabolism. Although abundant in soils, under aerobic conditions iron is primarily present in its oxidized form, Fe(III), which is very insoluble in water. Pseudomonads have elaborate iron uptake systems and secrete siderophores with high-affinity for Fe(III) (reviewed in Cornelis, 2010; Schalk and Guillon, 2013). Once Fe(III) has formed a complex with either a heme or an iron-siderophore (such as pyoverdine), it binds to a specific outer membrane receptor with a gate on its periplasmic side. This gate opens upon interaction with the TonB protein which, together with the ExbB and ExbD proteins, transmits the energy needed to open the gate. The ferrisiderophore thus gains access to the periplasm and, with the help of a periplasmic binding protein, is taken by a transporter to the cytoplasm. Here, Fe(III) is reduced to Fe(II) and incorporated into iron-containing proteins. The siderophore is either degraded or recycled.

1 Although essential for life, iron can be toxic if present in excessive amounts. Thus,
2 the expression of the genes involved in iron uptake is regulated according to the
3 cytoplasmic concentration of Fe(II). This primarily involves the Fur repressor, a number of
4 sigma and anti-sigma factors, and two small RNAs (PrrF1 and PrrF2). The mechanisms
5 entailed have been mostly studied in *P. aeruginosa*, but the key features (though perhaps
6 not the details) are likely conserved in *P. putida* (reviewed in Cornelis et al., 2009; Llamas
7 et al., 2014). When the intracellular concentration of Fe(II) is sufficiently high, it binds to
8 the Fur protein, and the Fur-Fe(II) complex binds to DNA at sites containing the so-called
9 Fur boxes. This represses the transcription of several genes involved in iron acquisition,
10 such as those coding for the iron-starvation extra-cytoplasmic function (ECF) sigma factors
11 and the TonB-dependent transporters of ferrisiderophores. The consequence is a
12 reduction of iron uptake, limiting its toxicity. The iron-starvation ECF sigma factors are
13 required to direct the RNA polymerase to specific genes involved in iron uptake and
14 homeostasis. As well as being controlled by Fur, their activity is also influenced by a
15 specific anti-sigma factor that binds to the ECF sigma and prevents its interaction with the
16 RNA polymerase core. Fur-Fe(II) also represses the transcription of the PrrF1 and PrrF2
17 sRNAs, which in turn inhibit the expression of several genes coding for proteins that
18 contain iron, such as succinate dehydrogenase (*sdh*) and superoxide dismutase (*sodB*)
19 (Wilderman et al., 2004). Thus, under iron-sufficient conditions, Fur indirectly activates the
20 expression of iron-containing proteins.

21 When iron becomes limiting, Fur detaches from DNA and repression is relieved,
22 allowing the production of iron uptake system molecules such as pyoverdine, the iron-
23 starvation ECF sigma factors, and PrrF1 and PrrF2 sRNAs. These sRNAs reduce the
24 production of iron-containing proteins, helping to modify the enzyme load of the cell
25 towards a configuration requiring less iron. The secretion of pyoverdine allows for Fe(III)
26 scavenging. In addition, upon transport of the ferripyoverdine complex through the outer
27 membrane receptor, a signal is transduced to the periplasmic domain of an anti-sigma
28 factor that is transmitted to its cytoplasmic domain. This causes the release of the

sequestered ECF sigma that can then bind the RNA polymerase core and direct it to transcribe the iron-starvation genes. *P. putida* KT2440 contains 13 ECF sigma factors presumably involved in iron acquisition, as well as 11 putative anti-sigma factors, the genes for which map adjacent to those coding for the ECF sigma factors (Martínez-Bueno et al., 2002). For 12 of the above sigma factors, the sigma/anti-sigma gene cluster also includes a gene coding for a ferric siderophore receptor or a heme receptor.

P. putida KT2440 produces pyoverdine, a high affinity siderophore; there is no evidence to suggest it produces any other (Matthijs et al., 2009). The inactivation of *hfq* led to a reduction in the mRNA levels of several genes believed involved in the synthesis and export of pyoverdine. Reductions were also seen for those representing the gene cluster PP_3798 to PP_3804, which codes for a cation ABC transporter and other membrane proteins (Fig. 2 and Table S2). Expression of the genes for the iron-storage protein bacterioferritin were reduced as well. Real-time RT-PCR analysis for some of these genes confirmed this reduction (see Table S5), and showed that the mRNA levels of some neighbour genes that did not show up in the RNA-seq assays either decreased (PP_3797, *fpvA*, PP_4245) or increased (*pvdS*). In contrast, the Hfq-deficient strain showed increased expression of several genes involved in the uptake of siderophores, such as those for several TonB-dependent ferric siderophore receptors, seven iron-related ECF sigma factors and their adjacent anti-sigmas, and the *exbB-exbD-tonB* genes that code for the TonB energy transducing system, which provides the energy required for the uptake of siderophores (Tables S2, S3 and S5; Fig. 2). The precise substrate specificity of each of these siderophore receptors is unknown, but they might interact either with different pyoverdine variants or with pyoverdines produced by other bacteria (Schalk, 2008). The precise genes controlled by each of the different ECF-sigma factors upregulated in the Hfq-null strain are not known either, although those coding for ECF-2, ECF-5, ECF-7, ECF-9, ECF-15 and ECF-19 are followed by genes that code for a ferric siderophore receptor or a haem receptor (Martínez-Bueno et al., 2002). The gene for ECF-16, which

1 was also upregulated in the present assays, is associated with a gene coding for a
2 probable efflux system of unknown function.

3 Interestingly, the ECF-4 sigma factor, also known as PvdS or Pfrl, showed elevated
4 expression in the Hfq-null strain, as demonstrated by real-time RT-PCR (Table S5).
5 However, both the RNA-seq and real-time RT-PCR assays indicated that its expression
6 was very low, consistent with earlier reports showing that, in *P. aeruginosa*, PvdS
7 expression is undetectable under iron-rich conditions such as those used here to culture
8 the cells for the RNA-seq assays (Tiburzi et al., 2008). PvdS directs the expression of
9 many genes involved in the synthesis of pyoverdine in *Pseudomonas syringae*, *P.*
10 *aeruginosa*, and presumably in *P. putida* as well (Visca et al., 2002; Swingle et al., 2008;
11 Edgar et al., 2017), including many of those for which the mRNA levels decreased upon
12 inactivation of *hfq*. The increase detected in *pvdS* mRNA in the *P. putida* Hfq-null strain did
13 not result in any greater expression of the pyoverdine-related genes under iron-replete
14 conditions; it may be that the PvdS concentrations achieved were too low to efficiently
15 compete for the RNA polymerase core. In *P. syringae*, the sequence motif that PvdS
16 recognizes at cognate promoters has been determined, and reveals the PvdS regulon to
17 include many genes involved in pyoverdine synthesis (Swingle et al., 2008). Some, but not
18 all, of the equivalent pyoverdine synthesis genes in *P. putida* have similar PvdS boxes
19 (Swingle et al., 2008). Thus, the regulation of these genes in these two *Pseudomonas*
20 species may show some differences.

21 Finally, it is worth noting that several of the genes related to iron acquisition for which
22 expression decreased in the Hfq-null strain, showed a similar behaviour in the Crc-null
23 strain (Fig. 2). This highlights the close functional relationship between these two proteins.

Influence of Hfq and Crc on the production of pyoverdine under iron-limiting and iron-replete conditions

For the RNA-seq assays, the cells were cultured in minimal salts medium supplemented with a mixture of cations, including iron; this has been used by many research groups to study *P. putida*. The iron concentration of this medium, as measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), was found to be $84.5 \pm 2.6 \mu\text{M}$. This is a non-limiting concentration that allows for efficient growth (Molina et al., 2005). Since the lack of Crc/Hfq led to the reduced expression of many genes related to pyoverdine synthesis under these iron-replete conditions, experiments were performed to determine whether Crc or Hfq had any impact on the amount of pyoverdine produced under high ($84.5 \mu\text{M}$) or low ($0.3 \mu\text{M}$) iron concentrations. To this end, cells were cultured in M9 succinate medium containing either 84.5 or $0.3 \mu\text{M}$ iron in black, clear-bottomed microtiter plates, and the amount of pyoverdine produced followed by measuring fluorescence over time at 30°C . Growth (A_{600}) was also monitored to normalize the fluorescence values to the number of cells present. Both the wild type and the Crc-null strain produced a strong fluorescence signal when cultured under iron-limiting conditions (Fig. 3A,B; continuous lines). The signal detected was very low when iron was present in excess (Fig. 3A,B; dashed lines). Under iron-replete conditions, the fluorescence signal recorded for the wild type and Crc-null strains was essentially the same (Fig. 3B). This indicates that the lesser expression of the pyoverdine production genes detected by the RNA-seq in the Crc-null strain is insufficient to generate a visible phenotype. The Hfq-null strain behaved differently. Under iron limiting conditions, the lack of Hfq led to a strong reduction in fluorescence (Fig. 3A), suggesting that pyoverdine production was much reduced compared to the wild type strain. At high iron concentrations, the lack of Hfq also reduced fluorescence production (Fig. 3B). PVD production was restored upon introduction into strain KT2440 Δ hfq of a plasmid bearing a wild type *hfq* gene (plasmid pHFQ, see Fig. 3C).

1 Similar results were obtained when pyoverdine production was assayed in agar
2 plates containing increasing concentrations of 2,2'-dipyridyl, a compound that chelates iron
3 leading to iron deprivation (Watson et al., 2010). Under high iron conditions, neither the
4 wild type nor the mutant strains tested produced pyoverdine at detectable levels. However,
5 the addition of 1.2 mM 2,2'-dipyridyl led to the secretion of the yellow/green pigment
6 characteristic of pyoverdine. This was much more abundant in the wild type and Crc-null
7 strains than in the Hfq-null strains (Fig. 3D). At higher 2,2'-dipyridyl concentrations, the
8 Hfq-deficient strains started to die off, presumably because they were unable to scavenge
9 enough iron from the medium. The wild type and Crc-null strains, in contrast, still produced
10 pyoverdine and survived (not shown).

11 Overall, the present results indicate that when Hfq is lacking, less pyoverdine is
12 produced than in the wild type strain. Even so, the absence of Hfq had little effect on the
13 intracellular iron concentration, as measured by ICP-MS, either under high or low iron
14 conditions (Fig. 4). Indeed, the cells were able to accumulate iron intracellularly at
15 concentrations higher than those present in the growth medium. The ability to accumulate
16 iron has also been observed in *P. aeruginosa* (Cunrath et al., 2016). It seems, therefore,
17 that the cells manage to counteract the lower pyoverdine levels produced when Hfq is
18 lacking by increasing the expression of pyoverdine receptors, iron-scavenging ECF sigma
19 factors, and the *exbB-exbD-tonB* energy transducing system (Fig. 2). This strategy
20 probably helps them scavenge enough iron to maintain intracellular concentrations similar
21 to those seen in the wild type.

22 The precise mechanism by which the absence of Hfq leads to a reduction in
23 pyoverdine production is currently unclear, but it might be due to a combination of factors.
24 One of these might be related to the IscR global regulator. In many bacteria, including *E.*
25 *coli* and pseudomonads, the *isc* genes are involved in the maturation of iron-sulphur
26 clusters, which are key components of the active centres of many enzymes. In *E. coli*, the
27 expression of the *isc* genes is repressed by the IscR transcriptional regulator in response
28 to high levels of these clusters (Schwartz et al., 2001), as well as by the iron-responsive

sRNA *rhyB* (Desnoyers et al., 2009). Interestingly, the increased expression of IscR in *P. aeruginosa* carrying a multicopy plasmid increases the total iron content of the cells and reduces siderophore production (Romsang et al., 2014). In the present work, the mRNA levels of *iscR* (PP_0841) in the *P. putida* Hfq/Crc-null strain were >5-fold higher than in the wild type strain (Table S3). In the Hfq-null strain a 2.96-fold increase was detected ($FDR < 10^{-6}$), value that is just below the fold-change filter imposed, precluding the gene from the list of those upregulated. It is likely, therefore, that the increase in the IscR concentration that occurs when Hfq is lacking leads to a concomitant reduction in pyoverdine production. This did not lead to a reduction in the iron content of the cells since, presumably, the reduction in pyoverdine production is compensated by increasing the expression of different ferric siderophore receptors, as well as that of the ExbB/ExbD/TonB energy transducing system. This would allow for a more efficient uptake of the pyoverdine available (see Fig. 2).

Influence of Hfq/Crc on the expression and levels of the PrrF1 and PrrF2 sRNAs

As mentioned above, the PrrF1 and PrrF2 sRNAs participate in maintaining iron homeostasis in *P. aeruginosa*. These have a role similar to that of *E. coli* RhyB sRNA, which acts by pairing to complementary regions in target mRNAs, inhibiting their translation and triggering their degradation by RNases (Masse and Gottesman, 2002; Massé et al., 2003; Geissmann and Touati, 2004). The *E. coli* Hfq protein binds to RhyB, facilitating its pairing to target mRNAs and preventing its degradation by RNases (Massé et al., 2003). In *P. aeruginosa*, the genes coding for PrrF1 and PrrF2 are located in tandem, and can be transcribed either as two independent sRNAs or as a single larger sRNA named PrrH (Wilderman et al., 2004; Oglesby-Sherrouse and Vasil, 2010). The expression of these sRNAs is repressed by Fur in the presence of high iron concentrations. Genes such as *sdhABCD* (succinate dehydrogenase), *bfrB* (bacterioferritin

B) and *katA* (catalase) have been proposed regulated by PrrF1 and PrrF2 (Wilderman et al., 2004).

PrrF1 and PrrF2 have also been localized in *P. putida*, although they are not located in tandem; PrrH is not, therefore, produced in this species (Wilderman et al., 2004; D'Arrigo et al., 2016). A detailed characterization of their regulation and influence in *P. putida* has been lacking. The precise 5'-ends of *P. putida* PrrF1 and PrrF2 were determined by primer extension assays (Fig. 5). The start of PrrF1 was found to be 15 nt downstream of that proposed earlier on the basis of RNA-seq analyses (D'Arrigo et al., 2016), while the 5'-end of PrrF2 was found 67 nt downstream of that previously proposed. The start sites were clearly preceded by consensus sequences for σ^{70} -RNA polymerase in the -35 and -10 regions of both promoters. The use of the Virtual Footprint tool (<http://www.prodoric.de/vfp/>; Münch et al., 2005) predicted the presence of a Fur box in both promoters, overlapping the -10 consensus region (Fig. 5). The sequence similarity of these putative Fur boxes to the 19 nt consensus described for Gram negative bacteria (Escobar et al., 1999) was 12 out of 19 positions for P_{prf1} , and 13 out of 19 for P_{prf2} . Both Fur boxes were 15 out of 19 bp identical to the respective ones in *P. aeruginosa* (Fig. S3). This suggests that Fur might regulate the expression of these two promoters according to iron availability, as proposed for *P. aeruginosa* (Wilderman et al., 2004). The end of the two sRNAs was sought by combining the reported approximate size of these sRNAs (D'Arrigo et al., 2016) with the output obtained from the ARNold software tool, which finds Rho-independent terminators (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/>). This suggested that the two sRNAs are very similar in size (PrrF1, ~116 nt; PrrF2, ~114 nt; see Fig. 5) and that they share extensive nucleotide similarity (80%).

A Northern blot assay using probes directed towards PrrF1 or PrrF2 rendered (in both cases) a single band of the expected size when using RNA obtained from cells cultured under low iron conditions. When iron was plentiful the band was clearly less intense (Fig 6A,B). The pattern was similar for both sRNAs. The intensity of the bands was quantified in three independent assays using the PrrF2 probe which, due to its extensive

similarity to PrrF1, likely hybridizes with both sRNAs. In the wild type strain, the transcript detected was at least 4-fold less abundant when iron was in excess ($P < 0.005$; Fig. 6C). Similar assays performed with the Crc-null, Hfq-null and Crc-Hfq-null strains showed that the absence of Crc had no influence on the abundance of PrrF1-F2, while the absence of Hfq led to a significant reduction in the sRNAs under low iron conditions (Fig. 6C). This suggests that Hfq affects the transcription or the stability of these sRNAs.

The possible influence of iron and Hfq on the activity of promoters P_{PrrF1} and/or P_{PrrF2} was analysed using transcriptional fusions involving the *lacZ* reporter gene. When cells were cultivated in aerated flasks containing M9 succinate medium, the activity of promoter P_{PrrF1} was greater under iron-limiting (0.3 μM) than under iron-replete (84.5 μM) conditions, although the difference was small (Fig. 7A). The influence of iron on the activity of promoter P_{PrrF2} was much more pronounced (Fig. 7B). In fact, at mid-exponential phase and under high iron conditions, the activity of P_{PrrF2} was about 6-fold lower than that of P_{PrrF1} , a difference that decreased to only 2-fold when iron was lacking. Therefore, promoter P_{PrrF2} is strongly repressed in the presence of iron, while the response of P_{PrrF1} to iron is much less strong. This suggests that the latter promoter might respond to other, unknown signals.

The inactivation of the *crc* and/or *hfq* genes had no influence on the activity of promoters P_{PrrF1} and P_{PrrF2} (Fig. 7C,D). This is in line with the observation that the inactivation of *crc* or *hfq* did not affect the amounts of Fur protein present (according to the iTRAQ assays), or the amount of iron in the cells (Fig. 4). Therefore, the smaller amounts of PrrF1 and PrrF2 sRNAs observed in the Hfq-null strain suggest that these sRNAs may be less stable when Hfq is lacking, presumably because Hfq can bind to and protect them from RNases. The low abundance of these sRNAs in the Hfq-null strain prevented their half-lives from being accurately determined.

Conclusions

Catabolite repression in pseudomonads mainly relies on the ability of Crc and Hfq to form stable tripartite complexes at target mRNAs, inhibiting their translation (Moreno et al., 2009b; Madhushani et al., 2015; Moreno et al., 2015; Sonnleitner et al., 2017). However, the results presented here support the view that these proteins participate in other, important regulatory processes, such as iron homeostasis, following a different strategy. In iron homeostasis, Hfq is the main protagonist, the function of Crc being to facilitate control of the amount of free Hfq in the cell. Crc can perform this task by being instrumental in the formation of stable Crc-Hfq-RNA complexes with the regulatory CrcZ and CrcY sRNAs, as well as in the production of these sRNAs. The results presented suggest that when most Crc molecules are sequestered by CrcZ/CrcY, a significant amount of free Hfq remains to perform its role as a riboregulator, most likely acting on a range of sRNAs. It should be recalled that the total amount of Crc and Hfq (free molecules plus those sequestered by CrcZ/CrcY) varies little under different physiological conditions, while that of CrcZ and CrcY changes substantially (Sonnleitner et al., 2006; Sonnleitner et al., 2009; Moreno et al., 2015).

Iron homeostasis in *Pseudomonas* relies on a number of regulatory elements, with the PrrF1 and PrrF2 sRNAs playing a key role (reviewed in Cornelis et al., 2009; Llamas et al., 2014). The present finding that the levels of these sRNAs decrease significantly in a mutant strain lacking Hfq suggests that at least part of the influence of Hfq on iron homeostasis derives from its ability to control the levels of these sRNAs, probably by protecting them from degradation by RNases. Certainly, the stability of the *E. coli* RyhB sRNA, which has a role similar to that of the PrrF1-F2 sRNAs, is compromised when Hfq is lacking (Massé et al., 2003). However, Hfq would also influence other elements of iron metabolism in *Pseudomonas*, for example the levels of the IscR regulator, as discussed above.

The presence of a link between iron and carbon metabolism makes sense since several key enzymes involved in the assimilation of carbon compounds require iron as cofactor. In particular, succinate dehydrogenase, a key enzyme in the assimilation of succinate (the carbon source used in this work), is a multimeric complex that contains three iron-sulphur clusters ([2Fe-2S], [4Fe-4S], and [3Fe-4S]) and a heme cofactor. It therefore has significant iron demands. In addition, it has long been known that the amount of siderophores produced by pseudomonads varies according to the carbon source used, which likely reflects the iron needs of the enzymes required by the cell to assimilate the carbon available (Hohnadel and Meyer, 1986). The participation of Hfq in iron homeostasis, together with its reported influence on stress tolerance, catabolite repression and quorum sensing (Sonnleitner et al., 2006; Sonnleitner and Blasi, 2014; Moreno et al., 2015; Arce-Rodríguez et al., 2016), highlights the importance of this riboregulator in the fine-tuning of cell physiology in pseudomonads.

Experimental procedures

Bacterial strains and culture media

The strains used in this work were *E. coli* DH5 α (Woodcock et al., 1989), *E. coli* HB101 (pRK600) (Kessler et al., 1992), *P. putida* KT2440 (Franklin et al., 1981), *P. putida* KT2440 Δ hfq (Arce-Rodríguez et al., 2016), *P. putida* KTVc (a *crc::aacC1* derivative of strain KT2440; this work), and the double mutant *P. putida* KTHC (KT2440 Δ hfq *crc::aacC1*; this work). *P. putida* KTVc and KTHC were derived from *P. putida* KT2440 and KT2440 Δ hfq respectively; the *crc* gene was replaced by an inactive *crc::aacC1* via allele-by-allele exchange using plasmid pCRC10Gm (Moreno et al., 2007). *E. coli* strains were grown at 37°C and *P. putida* strains at 30°C. Cells were cultivated in complete LB medium (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl) or in M9 minimal salts medium (Sambrook and Russell, 2001) supplemented with trace elements (Bauchop and Eldsen,

1960) plus 30 mM succinate as the carbon source. Iron-limited growth media were based on M9 medium, replacing the Fe_2SO_4 for $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at the same molar concentration.

When needed, antibiotics were added at the following concentrations: kanamycin 50 $\mu\text{g/mL}$, gentamicin 40 $\mu\text{g/mL}$, ampicillin 100 $\mu\text{g/mL}$. Cell growth was monitored by measuring turbidity at 600 nm.

Plasmids

To complement the Δhfq mutation in *trans*, a 669 bp DNA fragment including the *hfq* gene and its own promoter was PCR amplified from *P. putida* KT2440 chromosome using oligonucleotides HfqComp-fw-EcoRI and HfqComp-rv-HindIII (Table S1), and cloned into plasmid pGEM-T Easy (Promega). The insert was excised with NotI and introduced at the NotI site of plasmid pSEVA421 (Martínez-García et al., 2015a), obtaining plasmid pHFQ. After checking the integrity of the *hfq* sequence by DNA sequencing, plasmid pHFQ was introduced into *P. putida* strain KT2440 Δhfq .

To obtain transcriptional fusions of promoters *PprfF1* and *PprfF2* to the *lacZ* reporter gene, 159 bp and 292 bp DNA fragments containing, respectively, the promoters for the *prfF1* and *prfF2* genes, were PCR-amplified using *P. putida* KT2440 genomic DNA as a template and the oligonucleotide pairs PprfF1-fw and PprfF1-rv, or PprfF2-fw PprfF2B-rv (Table S1). These DNA fragments were cloned between the HindIII and BamHI sites of plasmid pSEVA225 (Martínez-García et al., 2015a) to generate a transcriptional fusion to the *lacZ* reporter gene. The plasmids obtained, named pPprfF1 and pPprfF2, respectively, were transformed into *P. putida* KT2440 and its by-products KT2440 Δhfq , KTVC and KTHC.

RNA purification

To obtain total RNA for use in real-time RT-PCR assays, cells were grown at 30°C in aerated flasks in M9 minimal salts medium containing 30 mM succinate as the carbon source. At mid-exponential phase ($A_{600}=0.6$), 20 ml samples were collected, harvested by

centrifugation, and frozen at -70°C . Total RNA was purified from cell pellets using the RNeasy RNA purification kit (QIAGEN). Purified RNA was treated with RNase-free DNase I (TURBO DNase-free, Ambion), as indicated by the manufacturer. RNA integrity was analysed by agarose gel electrophoresis. The absence of DNA in the RNA preparations was tested by real-time PCR using primers for *rpoN* (Morales et al., 2006). Since this method is of no use for RNAs smaller than 300–400 bp, an alternative procedure was used when sRNAs were the targets of analysis. The cells were collected by centrifugation from 40 ml of culture and RNA purification then performed using the TRIzol Max Bacterial Isolation Kit (Ambion), following the manufacturer's instructions.

Real-time RT-PCR

For real-time RT-PCR assays, RNA preparations obtained from three independent cultures (three biological replicas) were used. RNA was transformed into cDNA using the cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed as previously described (Morales et al., 2006; Moreno et al., 2010) using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) and the primers listed in Table S1. The results were normalized relative to those obtained for the *rpoN* gene, the expression of which remains constant throughout the growth curve under a range of growth conditions (Cases et al., 1996; Yuste et al., 2006).

RNA-seq assays

P. putida strains KT2440, KT2440 Δ *hfq*, KTVC, and the double mutant KTHC, were cultured in M9 minimal salts medium containing succinate as the carbon source to a turbidity of 0.6. Cells were collected by centrifugation at 4°C and total RNA purified using the RNeasy kit (QIAGEN). It was then treated with the RNase-free DNase Set Kit (QIAGEN) to completely eliminate all residual DNA. RNA quality was examined using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). RNA-seq library construction and deep-sequencing were carried out by the Genomics Unit at the *Parque Científico de Madrid* (Madrid, Spain). Ribosomal RNA was eliminated using the Ribo-Zero rRNA Removal Kit

1 for bacteria (Illumina). Directional (strand-specific) libraries were constructed using the
2 Illumina mRNA Sequencing Sample Preparation Kit (TruSeq) and sequenced in single-
3 end-read format (1x150) using the Illumina HiSeq™ 2000 system (Illumina). To obtain a
4 homogeneous sequence dataset, short reads were quality-checked with FastQC
5 (Babraham Bioinformatics; <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>).
6 These were then aligned against the *P. putida* KT2440 genome (NCBI reference sequence
7 NC_002947.3) using Bowtie2 software (Langmead and Salzberg, 2012) employing the
8 default parameters. About 3 million reads were obtained for each sample, 96-99% of which
9 could be aligned with the *P. putida* KT2440 chromosome. Most were unique hits (>92.45%
10 of total reads). Sorting and indexing of the alignment files (.bam files) was performed using
11 the SAMtools software package (Li et al., 2009). The genomic alignment of the reads was
12 visualized using the IGV browser (Robinson et al., 2011). Unique aligned reads were
13 assigned to bacterial genes (quantification) with the HTSeq-count function of HTSeq
14 Python package (Anders et al., 2015). The differential expression of genes between
15 samples was quantified using the Bioconductor edgeR package (Robinson et al., 2010),
16 employing the default parameters. Since only one sample from each strain was analysed
17 by RNA-seq, the statistical significance of the results was estimated using the
18 recommended imputed dispersion value of 0.1² (Bioconductor edgeR manual; Robinson et
19 al., 2010). This allowed false discovery rates (FDR) to be estimated. The FIESTA viewer
20 was used to filter differentially expressed genes (Oliveros, 2007). Results of interest were
21 confirmed by independent real-time RT-PCR assays. The complete raw dataset for the
22 RNA-seq assays were deposited at the NCBI's Gene Expression Omnibus site
23 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) under accession code GSE110803.

24

25 *Quantitative analysis of proteomes by mass spectrometry (MS) using isobaric tagging*
26 *relative and absolute quantitation (iTRAQ)*

27 Proteomic analyses were performed at the CNB-CSIC proteomics facility (Madrid, Spain;
28 <http://proteo.cnb.csic.es/proteomica/>). Briefly, *P. putida* KT2440, KT2440Δ*hfq*, KTVC and

1 the double mutant KTHC were cultured in M9 minimal medium with succinate as the
2 carbon source. At mid-exponential phase ($A_{600}=0.6$), 20 ml of culture were withdrawn and
3 the cells harvested by centrifugation at 4°C. The pellets were resuspended in 2 ml of a
4 lysis buffer containing 20 mM Tris, 7 M urea, 2 M thiourea, 5% (w/v) 3-((3-
5 cholamidopropyl)dimethylammonium)-1-propanesulfonate (CHAPS) and protease inhibitor
6 cocktail tablets (Roche). Cells were disrupted by sonication on ice and the debris
7 eliminated by centrifugation at 14,000 rpm for 30 min at 4°C. Proteins in the supernatant
8 were precipitated with methanol/chloroform (Wessel and Flugge, 1984) and resuspended
9 in 160 μ l of a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea and 100 mM tetraethylammonium
10 bromide. For iTRAQ tagging, 40 μ g of proteins from each sample were digested overnight
11 at 37°C with 4 μ g of trypsin (Sigma-Aldrich). The resulting peptides were labelled for 2 h
12 with iTRAQ tags (AB Sciex; one tag for each strain, 8-plex procedure) according to the
13 manufacturer's recommendations. The labelled samples were mixed and cleaned through
14 a C18 SEP-PAK column. An amount of sample equivalent to a total of 1 μ g of labelled
15 peptides was then analysed by liquid chromatography/mass spectrometry in an AB Sciex
16 TRIPLE Q-TOF mass spectrometer.

17 Protein identification and the analysis of protein differential expression were
18 performed by Proteobiotics S.L. (Madrid, Spain). Briefly, MS/MS spectra were exported to
19 *mgf* format using Peak View v1.2.0.3 and searched using Mascot Server 2.5.1, OMSSA
20 2.1.9, X!TANDEM 2013.02.01.1, and Myrimatch 2.2.140, against a composite target/decoy
21 database built from the 5313 *Pseudomonas putida* (strain KT2440) sequences at Uniprot
22 Knowledgebase (November 2015), together with commonly occurring contaminants.
23 Search engines were configured to match potential peptide candidates with a mass error
24 tolerance of 25 ppm and fragment ion tolerance of 0.02Da, allowing for up to two missed
25 tryptic cleavage sites and a maximum isotope error (^{13}C) of 1, considering fixed methyl-
26 methane-thiosulphonate (MMTS) modification of cysteine and variable oxidation of
27 methionine, pyroglutamic acid from glutamine or glutamic acid at the peptide N-terminus,

and modification of lysine and peptide N-terminus with Tandem Mass Tags (TMT) 6-plex reagents. Score distribution models were used to compute peptide-spectrum match p -values (Ramos-Fernández et al., 2008), and spectra recovered by a $FDR \leq 0.01$ (peptide-level) filter were selected for quantitative analysis. Approximately 1% of the signals with the lowest quality were removed prior to further analysis. Differential regulation was measured using linear models (López-Serra et al., 2014), and statistical significance was measured using q -values (FDR). All analyses were conducted using software from Proteobotics (Madrid, Spain). Proteins showing an abundance change of ≥ 1.4 fold (\log_2 of 0.49), and a q -value of ≤ 0.05 , were considered differentially expressed.

Determination of bacterial cell iron content (ICP-MS)

When cultures reached a turbidity of 0.6 (A_{600}), cells from 15 ml samples were collected by centrifugation, dissolved in 20% nitric acid, and boiled. The iron content of the samples was determined by ICP-MS at the *Servicio Interdepartamental de Investigación*, belonging to the *Universidad Autónoma de Madrid* (Spain). The raw data (in $\mu\text{g/L}$) were normalized relative to the number of cells present in the sample (absorbance at 600 nm). The iron concentrations provided are the mean of two biological replicates.

Pyoverdine detection

Pyoverdine production was determined by fluorescence spectroscopy (excitation 405 nm, emission 460 nm), normalizing the fluorescence value obtained to the cell density of the culture ($A_{600 \text{ nm}}$), essentially as previously described (Baysse et al., 2001; Guillon et al., 2012). Cells were cultured to stationary phase in LB medium, washed extensively three times in minimal salts M9 medium lacking iron, and inoculated into M9 medium containing either 84.5 or 0.3 μM iron to a turbidity of 0.03 (A_{600}). 150 μl of the suspension were transferred (in triplicate) to 96-well black microtiter plates with clear flat bottoms (Costar). These were then incubated at 30°C with agitation in a Tecan microplate reader, measuring

fluorescence and cell growth (A_{600}) every 10 min for 18 h. Results are expressed as the mean of three technical replicates. Two independent assays were performed.

To detect pyoverdine production in solid media, cells were cultured as indicated above, and 10 μ l deposited on minimal salts M9 medium agar plates (1.5% agar) containing 84.5 μ M iron, 30 mM succinate, and increasing concentrations of 2,2'-dipyridyl. The plates were incubated at 30°C for 48 h and pyoverdine production visualized by illumination with white light.

Northern blots

To generate an RNA probe against the PprF1 and PrrF2 sRNAs, a DNA segment including the complete sRNA region was PCR amplified using primers prrF1-dir-EcoRI and prrF1-rev-PstI, or prrF2-dir-EcoRI and prrF2-rev-PstI (Table S1), which include restriction sites for EcoRI and PstI endonucleases. The resulting DNA fragments were digested with EcoRI and PstI and cloned into plasmid pSPT18 (Roche), to obtain plasmids pSPT18-prrF1 and pSPT18-prrF2. These were linearized with EcoRI and employed as a template for an *in vitro* transcription reaction using the DIG RNA labelling kit (Roche) and SP6 RNA polymerase. To generate a probe against the 5S ribosomal RNA, a DNA fragment corresponding to the gene specifying the 5S RNA was PCR-amplified using primers 5S-HindIII-fw and 5S-EcoRI-rv (Table S1), and the resulting fragment cloned between the HindIII and EcoRI sites of plasmid pSPT18, generating plasmid pSPT18-5S. This plasmid was linearized with HindIII and used as a template for an *in vitro* transcription reaction with T7 RNA polymerase as indicated above (Hernández-Arranz et al., 2016).

For Northern blots, 2.5 μ g total RNA purified from the indicated strains were resolved by electrophoresis on a 6% polyacrylamide gel containing 7 M urea and transferred to a Nylon Hybond N+ membrane (GE Healthcare Biosciences) with a semi-dry transfer unit (Trans-blot SD. Bio-Rad; 400 mA, 1 h). Membranes were UV-crosslinked and hybridized with a mixture of DIG-labelled probes against PrrF1-F2 and 5S. Bands were detected using the DIG Luminescent Detection Kit (Roche) and visualized by exposure to Agfa X-

ray film, or with a Chemidoc device (BioRad). The latter was used to quantify band intensity. The results shown are the mean of three independent assays.

Identification of the prrF1 and prrF2 transcription start sites by primer extension

The oligonucleotides used as primers for the extension reactions, PE PprF1-INV and PE PprF2B-INV (see Table S1), were end-labelled with [γ - 32 P]ATP and T4 polynucleotide kinase. 25 μ g of RNA (obtained as indicated above) were mixed with 10 pmol of the end-labelled primer and heated (80°C, 5 min). The oligonucleotide was allowed to anneal to the RNA by incubation (23°C, 5 min). Primer extension was performed with 200 U SuperScript III (Promega) at 55°C, as indicated by the supplier. The extended cDNA products were analysed by electrophoresis on a denaturing 6% urea-polyacrylamide gel, in parallel with a DNA sequence ladder obtained by the chemical sequencing (Maxam and Gilbert, 1980) of a DNA fragment obtained via PCR using oligonucleotides PE PprF1-DIR and PE PprF1-INV (the latter labelled with [γ - 32 P]ATP using T4 polynucleotide kinase), employing *P. putida* chromosomal DNA as template. The gel was dried, exposed to a phosphorimager screen and visualized using a Personal Molecular Imager (BioRad).

Assay for β -galactosidase

Overnight cultures in minimal salts M9 medium containing succinate as the carbon source were centrifuged and washed three times with M9 salts medium (i.e., lacking the trace elements solution, and therefore iron), and finally diluted to a turbidity (A_{600}) of 0.05 in fresh M9 succinate medium containing the amount of iron indicated in each assay. Cells were allowed to grow at 30°C with vigorous aeration; aliquots were taken at various times and β -galactosidase activity measured using o-nitrophenyl- β -D-galactoside as a substrate (Miller, 1972). Three independent assays were performed.

1 **Acknowledgements**

2 We are grateful to V. de Lorenzo for providing the *P. putida* Hfq-null strain, and to J.C.
3 Oliveros for help in the design and interpretation of RNA-seq assays. DS-H received a
4 predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Science and Competitiveness
5 (MINECO). This work was funded by grant BIO2015-66203-P (AEI/FEDER, UE).

6

For Peer Review Only

Figure Legends

Figure 1. Number of genes for which RNA levels were altered by more than 3-fold in strains KTVC (Crc-null, green circle), KT2440 Δ *hfq* (Hfq-null, blue circle) and KTHC (Crc-null, Hfq-null, pink circle), compared to the wild type (KT2440), as deduced in RNA-seq assays. Genes affected in more than one mutant strain are indicated in the intersections of the circles. Cells were cultivated in M9 minimal salts medium containing succinate as the carbon source. The most important functions or genes affected in each mutant strain are indicated on the right.

Figure 2. Effect of Hfq on the expression of genes involved in iron metabolism. **(A)** Simplified diagram of the synthesis, export and uptake of pyoverdine in *Pseudomonas*, and the involvement of the Fur protein and the PrrF1 and PrrF2 sRNAs in the regulation of iron homeostasis. The diagram is based on what it is known for different pseudomonads (see Cornelis et al., 2009; Cornelis, 2010; Schalk and Guillon, 2013). **(B)** Genes related to the synthesis, export, uptake and regulation of ferric siderophores, or to iron storage, that showed either increased (in red) or reduced (in green) RNA levels in the Crc-null (labelled as “1”), Hfq-null (labelled as “2”), or Crc/Hfq-null (labelled as “3”) strains relative to the wild type. The colours in (A) indicate the expression trend (e.g., pyoverdine receptors are indicated in red, although some of them showed reduced expression in the mutant strains analysed).

Figure 3. Effect of Crc and Hfq on the production of pyoverdine. *P. putida* KT2440 (wild type), KTVC (Crc-null), KT2440 Δ *hfq* (Hfq-null) and KTHC (Crc-null, Hfq-null) were inoculated at a turbidity of 0.03 (A_{600}) in minimal salts M9 succinate medium containing either 84.5 or 0.3 μ M iron, transferred to a 96-well black clear-bottomed microtiter plate, and allowed to grow at 30°C. The amount of pyoverdine produced was followed by measuring fluorescence over time, as indicated in Experimental Procedures. Growth (A_{600})

was also monitored to normalize the fluorescence values relative to the turbidity of the cultures. **(A)** Fluorescence profiles (normalised to A_{600}) for cells cultured under high (scattered lines) or low (continuous lines) iron concentrations. **(B)** Enlarged view of the fluorescence profile observed under low iron conditions. **(C)** Complementation of the *hfq* mutation by a plasmid bearing a wild type copy of the *hfq* gene (plasmid pHFQ). *P. putida* strains KT2440 (wt), KTVC (*crc*), KT2440 Δ *hfq* (*hfq*) and KT2440 Δ *hfq* containing plasmid pHFQ (*hfq*-pHFQ) were inoculated at a turbidity of 0.03 (A_{600}) in iron-deficient medium (0.3 μ M iron); fluorescence was determined 4 hours later and normalised to A_{600} . Values are the average of three assays; the significance of the difference between the signal obtained for each strain relative to that of the wild type strain is indicated (one-way ANOVA; ***, $P < 0.001$; “ns”, no significant difference). **(D)** Production of pyoverdine in agar plates. 10 μ l of M9 succinate medium containing about 10^6 cells of the bacterial strains indicated above were spotted onto an M9 succinate medium agar plate containing 84.5 μ M iron. Where indicated, 1.2 mM of 2,2'-dipyridyl (DPD) were added to chelate the iron. Plates were incubated at 30°C; pyoverdine production can be visualized as a yellow/green pigment surrounding the bacteria.

Figure 4. Total content of iron in cells. *P. putida* KT2440 (wild type), KTVC (*Crc*-null), KT2440 Δ *hfq* (*Hfq*-null) and KTHC (*Crc*-null, *Hfq*-null) were cultured in M9 succinate medium containing low (0.3 μ M) or high (84.5 μ M) iron concentrations. At mid exponential phase ($A_{600}=0.6$), the cells were collected and their iron concentration determined by ICP-MS as indicated in Experimental Procedures. The data obtained were normalized relative to the number of cells present in the sample (absorbance at 600 nm). The values indicated are the means of three biological replicates. The initial iron concentration of the growth medium used is indicated with a red line.

Figure 5. Identification of the promoters of the genes encoding the PrrF1 and PrrF2 sRNAs. **(A, B)** Location of the genes *prrF1* **(A)** and *prrF2* **(B)**; the sequence of each sRNA is indicated in bold. The position of the transcription start site, as determined by primer extension (see C), is indicated by an arrow. The sequences at the -10 and -35 regions showing similarity to the consensus for the vegetative sigma factor are depicted, as are possible Rho-independent transcriptional terminators (stem-loops indicated by grey arrows), and a sequence showing similarity to the binding sequence of the Fur protein (red rectangle; for additional details, see Fig. S3). **(C)** Transcription start sites determined by primer extension, using RNA obtained from cells growing exponentially in M9 succinate medium containing 0.3 μ M iron, and an appropriate end-labelled oligonucleotide (see Experimental Procedures). The size of the cDNA obtained was analysed in a denaturing urea-polyacrylamide gel; it was run side by side with a DNA sequence ladder obtained by the chemical sequencing of a 5'-end labelled DNA fragment (G+A reaction; indicated as "M"; Maxam and Gilbert, 1980). Arrows labelled "+1" indicate bands corresponding to the cDNA derived from the transcripts originated at promoters P_{prrF1} or P_{prrF2} .

Figure 6. Effect of Crc, Hfq and iron concentration on the levels of PrrF1 and PrrF2. Total RNA obtained from cells of strains KT2440 (wild type), KTVC (Crc-null), KT2440 Δ hfq (Hfq-null) and KTHC (Crc-null, Hfq-null), cultured in M9 succinate medium containing low (0.3 μ M) or high (84.5 μ M) iron concentrations, was resolved by denaturing gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. The presence of PrrF1 and PrrF2 was determined by hybridization with appropriate probes. **(A)** Probe complementary to the complete PrrF1 sequence; RNA was obtained from cells cultured under low iron conditions. **(B)** Probe complementary to the complete PrrF2 sequence; RNAs obtained from cells cultured under low (L) or high (H) iron conditions. A probe complementary to 5S rRNA was included in all cases as a loading control. Note that since PrrF1 and PrrF2 are very similar in size and sequence, and the electrophoresis was performed in 7 cm-long gels, the assay was unable to distinguish them. **(C)** PrrF1-F2 abundance; data are the

means and standard deviations of three assays. The significance of the differences between the indicated pairs (deduced via the two-tailed *t*-test) is shown (* $P < 0.1$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; “ns”, no significant difference).

Figure 7. Effect of iron concentration (**A, B**), and of the Crc and Hfq proteins (**C, D**), on the activity of the P_{prfF1} and P_{prfF2} promoters. (**A, B**) *P. putida* KT2440 containing plasmids pPprfF1 (contains a P_{prfF1} -*lacZ* transcriptional fusion) or pPprfF2 (contains a P_{prfF2} -*lacZ* transcriptional fusion) was cultured in M9 succinate medium containing high (84.5 μ M, continuous line) or low (0.3 μ M, dashed line) iron, and β -galactosidase activity measured at different times. The graph shows the values recorded as a function of cell growth (A_{600}). (**C, D**) *P. putida* KT2440 (wild type), KTVC (Crc-null), KT2440 Δ hfq (Hfq-null) and KTHC (Crc-null, Hfq-null) harbouring plasmids pPprfF1 or pPprfF2 were cultured in M9 succinate medium containing 0.3 μ M iron, and their β -galactosidase activity measured. The figure shows the values observed in samples obtained at mid-exponential phase (A_{600} 0.6-0.8). Three independent assays were performed; the differences in promoter activity between the wild type and the mutant strains were not significant (one-way ANOVA).

References

- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015) HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**: 166-169.
- Arce-Rodríguez, A., Calles, B., Nikel, P.I., and de Lorenzo, V. (2016) The RNA chaperone Hfq enables the environmental stress tolerance super-phenotype of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **18**: 3309-3326.
- Bauchop, T., and Eldsen, S.R. (1960) The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *J Gen Microbiol* **23**: 457-569.
- Baysse, C., Matthijs, S., Pattery, T., and Cornelis, P. (2001) Impact of mutations in *hemA* and *hemH* genes on pyoverdine production by *Pseudomonas fluorescens* ATCC17400. *FEMS Microbiol Lett* **205**: 57-63.
- Belda, E., van Heck, R.G., Jose Lopez-Sanchez, M., Cruveiller, S., Barbe, V., Fraser, C. et al. (2016) The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. *Environ Microbiol* **18**: 3403-3424.
- Cases, I., de Lorenzo, V., and Pérez-Martín, J. (1996) Involvement of sigma 54 in exponential silencing of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid *Pu* promoter. *Mol Microbiol* **19**: 7-17.
- Cornelis, P., Matthijs, S., and Van Oeffelen, L. (2009) Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals* **22**: 15-22.
- Cornelis, P. (2010) Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1637-1645.
- Cunrath, O., Geoffroy, V.A., and Schalk, I.J. (2016) Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*: a role for siderophores. *Environ Microbiol* **18**: 3258-3267.
- D'Arrigo, I., Bojanovic, K., Yang, X., Holm Rau, M., and Long, K.S. (2016) Genome-wide mapping of transcription start sites yields novel insights into the primary transcriptome of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **18**: 3466-3481.
- Desnoyers, G., Morissette, A., Prevost, K., and Masse, E. (2009) Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA *iscRSUA*. *EMBO J* **28**: 1551-1561.

- 1 Edgar, R.J., Hampton, G.E., Garcia, G.P.C., Maher, M.J., Perugini, M.A., Ackerley, D.F., and
2 Lamont, I.L. (2017) Integrated activities of two alternative sigma factors coordinate iron
3 acquisition and uptake by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **106**: 891-904.
- 4 Escolar, L., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1999) Opening the iron box: transcriptional
5 metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**: 6223-6229.
- 6 Ferrara, S., Carloni, S., Fulco, R., Falcone, M., Macchi, R., and Bertoni, G. (2015) Post-
7 transcriptional regulation of the virulence-associated enzyme AlgC by the sigma(22) -dependent
8 small RNA ErsA of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **17**: 199-214.
- 9 Franklin, F.C., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M., and Timmis, K.N. (1981) Molecular and
10 functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes
11 for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway. *Proc Nat Acad Sci USA* **78**: 7458-
12 7462.
- 13 García-Mauriño, S.M., Pérez-Martínez, I., Amador, C.I., Canosa, I., and Santero, E. (2013)
14 Transcriptional activation of the CrcZ and CrcY regulatory RNAs by the CbrB response regulator
15 in *Pseudomonas putida*. *Mol Microbiol* **89**: 189-205.
- 16 Geissmann, T.A., and Touati, D. (2004) Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA
17 determines access for small RNA regulator. *EMBO J* **23**: 396-405.
- 18 Grenga, L., Chandra, G., Saalbach, G., Galmozzi, C.V., Kramer, G., and Malone, J.G. (2017)
19 Analyzing the Complex Regulatory Landscape of Hfq - an Integrative, Multi-Omics Approach.
20 *Front Microbiol* **8**: 1784.
- 21 Guillon, L., El Mecherki, M., Altenburger, S., Graumann, P.L., and Schalk, I.J. (2012) High cellular
22 organization of pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: clustering of PvdA at the
23 old cell pole. *Environ Microbiol* **14**: 1982-1994.
- 24 Hernández-Arranz, S., Moreno, R., and Rojo, F. (2013) The translational repressor Crc controls the
25 *Pseudomonas putida* benzoate and alkane catabolic pathways using a multi-tier regulation
26 strategy. *Environ Microbiol* **15**: 227-241.
- 27 Hernández-Arranz, S., Sánchez-Hevia, D., Rojo, F., and Moreno, R. (2016) Effect of Crc and Hfq
28 proteins on the transcription, processing, and stability of the *Pseudomonas putida* CrcZ sRNA.
29 *RNA* **22**: 1902-1917.

- 1 Hester, K.L., Lehman, J., Najar, F., Song, L., Roe, B.A., MacGregor, C.H. et al. (2000) Crc is
2 involved in catabolite repression control of the *bkd* operons of *Pseudomonas putida* and
3 *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 1144-1149.
- 4 Hohnadel, D., and Meyer, J.M. (1986) Pyoverdine-Facilitated Iron Uptake Among Fluorescent
5 Pseudomonads. In *Iron, Siderophores, and Plant Diseases; NATO ASI Series (Series A: Life*
6 *Sciences)*. Swinburne, T.R. (ed): Springer, Boston, MA, pp. 119-129.
- 7 Kessler, B., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1992) A general system to integrate *lacZ* fusions into
8 the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the *Pm* promoter of the TOL
9 plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* **233**: 293-301.
- 10 La Rosa, R., de la Peña, F., Prieto, M.A., and Rojo, F. (2014) The Crc protein inhibits the production
11 of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* under balanced carbon/nitrogen growth
12 conditions. *Environ Microbiol* **16**: 278-290.
- 13 La Rosa, R., Nogales, J., and Rojo, F. (2015) The Crc/CrcZ-CrcY global regulatory system helps
14 the integration of gluconeogenic and glycolytic metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environ*
15 *Microbiol* **17**: 3362-3378.
- 16 Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*
17 **9**: 357-359.
- 18 Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N. et al. (2009) The Sequence
19 Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**: 2078-2079.
- 20 Linares, J.F., Moreno, R., Fajardo, A., Martínez-Solano, L., Escalante, R., Rojo, F., and Martínez,
21 J.L. (2010) The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and
22 virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **12**: 3196-3212.
- 23 Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time
24 quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ Method. *Methods* **25**: 402-408.
- 25 Llamas, M.A., Imperi, F., Visca, P., and Lamont, I.L. (2014) Cell-surface signaling in *Pseudomonas*:
26 stress responses, iron transport, and pathogenicity. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 569-597.
- 27 López-Serra, P., Marcilla, M., Villanueva, A., Ramos-Fernández, A., Palau, A., Leal, L. et al. (2014)
28 A DERL3-associated defect in the degradation of SLC2A1 mediates the Warburg effect. *Nat*
29 *Commun* **5**: 3608.

- 1 MacGregor, C.H., Wolff, J.A., Arora, S.K., Hylemon, P.B., and Phibbs, P.V., Jr. (1992) Catabolite
2 repression control in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas, molecular biology and*
3 *biotechnology*. Galli, E., Silver, S., and Witholt, B. (eds). Washington, D.C: American Society for
4 Microbiology, pp. 198-206.
- 5 Madhushani, A., Del Peso-Santos, T., Moreno, R., Rojo, F., and Shingler, V. (2015) Transcriptional
6 and translational control through the 5'-leader region of the *dmpR* master regulatory gene of
7 phenol metabolism. *Environ Microbiol* **17**: 119-133.
- 8 Martínez-Bueno, M.A., Tobes, R., Rey, M., and Ramos, J.L. (2002) Detection of multiple
9 extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440
10 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environ Microbiol* **4**: 842-855.
- 11 Martínez-García, E., and de Lorenzo, V. (2011) Engineering multiple genomic deletions in Gram-
12 negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida*
13 KT2440. *Environ Microbiol* **13**: 2702-2716.
- 14 Martínez-García, E., Aparicio, T., Goñi-Moreno, A., Fraile, S., and de Lorenzo, V. (2015a) SEVA
15 2.0: an update of the Standard European Vector Architecture for de-/re-construction of bacterial
16 functionalities. *Nucleic Acids Res* **43**: D1183-1189.
- 17 Martínez-García, E., Jatsenko, T., Kivisaar, M., and de Lorenzo, V. (2015b) Freeing *Pseudomonas*
18 *putida* KT2440 of its proviral load strengthens endurance to environmental stresses. *Environ*
19 *Microbiol* **17**: 76-90.
- 20 Masse, E., and Gottesman, S. (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in
21 iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4620-4625.
- 22 Massé, E., Escorcia, F.E., and Gottesman, S. (2003) Coupled degradation of a small regulatory
23 RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **17**: 2374-2383.
- 24 Matthijs, S., Laus, G., Meyer, J.M., Abbaspour-Tehrani, K., Schafer, M., Budzikiewicz, H., and
25 Cornelis, P. (2009) Siderophore-mediated iron acquisition in the entomopathogenic bacterium
26 *Pseudomonas entomophila* L48 and its close relative *Pseudomonas putida* KT2440. *Biometals*
27 **22**: 951-964.
- 28 Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical
29 cleavages. *Methods Enzymol* **65**: 499-560.

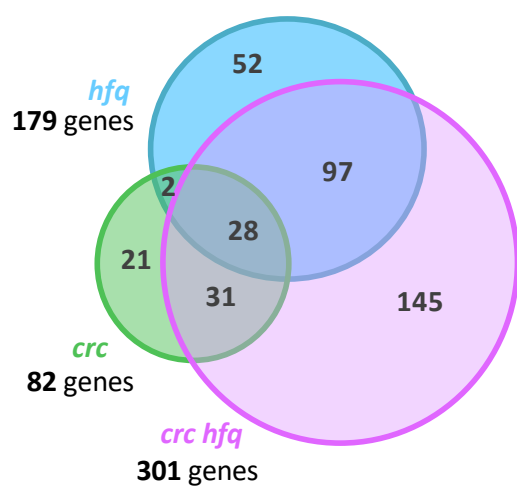
- 1 Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor
2 Laboratory.
- 3 Molina, M.A., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M.I., Munoz, N., Ramos, J.L., and Espinosa-Urgel, M.
4 (2005) Role of iron and the TonB system in colonization of corn seeds and roots by
5 *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **7**: 443-449.
- 6 Morales, G., Linares, J.F., Beloso, A., Albar, J.P., Martínez, J.L., and Rojo, F. (2004) The
7 *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several
8 chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *J Bacteriol* **186**: 1337-1344.
- 9 Morales, G., Ugidos, A., and Rojo, F. (2006) Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome o
10 ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression
11 of the CIO and *cbb3-1* terminal oxidases. *Environ Microbiol* **8**: 1764-1774.
- 12 Moreno, R., Ruiz-Manzano, A., Yuste, L., and Rojo, F. (2007) The *Pseudomonas putida* Crc global
13 regulator is an RNA binding protein that inhibits translation of the AlkS transcriptional regulator.
14 *Mol Microbiol* **64**: 665-675.
- 15 Moreno, R., Martínez-Gomariz, M., Yuste, L., Gil, C., and Rojo, F. (2009a) The *Pseudomonas*
16 *putida* Crc global regulator controls the hierarchical assimilation of amino acids in a complete
17 medium: evidence from proteomic and genomic analyses. *Proteomics* **9**: 2910-2928.
- 18 Moreno, R., Marzi, S., Romby, P., and Rojo, F. (2009b) The Crc global regulator binds to an
19 unpaired A-rich motif at the *Pseudomonas putida alkS* mRNA coding sequence and inhibits
20 translation initiation *Nucleic Acids Res* **37**: 7678-7690.
- 21 Moreno, R., Fonseca, P., and Rojo, F. (2010) The Crc global regulator inhibits the *Pseudomonas*
22 *putida* pWW0 toluene/xylene assimilation pathway by repressing the translation of regulatory
23 and structural genes. *J Biol Chem* **285**: 24412-24419.
- 24 Moreno, R., Fonseca, P., and Rojo, F. (2012) Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to
25 sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression.
26 *Mol Microbiol* **83**: 24-40.
- 27 Moreno, R., and Rojo, F. (2014) Features of pseudomonads growing at low temperatures: another
28 facet of their versatility. *Environ Microbiol Rep* **6**: 417-426.
- 29 Moreno, R., Hernández-Arranz, S., La Rosa, R., Yuste, L., Madhushani, A., Shingler, V., and Rojo,
30 F. (2015) The Crc and Hfq proteins of *Pseudomonas putida* cooperate in catabolite repression

- 1 and formation of ribonucleic acid complexes with specific target motifs. *Environ Microbiol* **17**:
2 105-118.
- 3 Münch, R., Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Klein, J., Schobert, M., and Jahn, D. (2005) Virtual
4 Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes.
5 *Bioinformatics* **21**: 4187-4189.
- 6 Nelson, K.E., Weinell, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A. et al.
7 (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile
8 *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799-808.
- 9 Nikel, P.I., Martínez-García, E., and de Lorenzo, V. (2014) Biotechnological domestication of
10 pseudomonads using synthetic biology. *Nat Rev Microbiol* **12**: 368-379.
- 11 Oglesby-Sherrouse, A.G., and Vasil, M.L. (2010) Characterization of a heme-regulated non-coding
12 RNA encoded by the *prfF* locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **5**: e9930.
- 13 Oliveros, J.C. (2007). FIESTA@BioinfoGP. An interactive server for analysing DNA microarrays
14 experiments with replicates. URL <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>
- 15 Poblete-Castro, I., Becker, J., Dohnt, K., Dos Santos, V.M., and Wittmann, C. (2012) Industrial
16 biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**: 2279-
17 2290.
- 18 Pusic, P., Tata, M., Wolfinger, M.T., Sonnleitner, E., Haussler, S., and Blasi, U. (2016) Cross-
19 regulation by CrcZ RNA controls anoxic biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*
20 **6**: 39621.
- 21 Quiroz-Rocha, E., Moreno, R., Hernandez-Ortiz, A., Fragoso-Jimenez, J.C., Muriel-Millan, L.F.,
22 Guzman, J. et al. (2017) Glucose uptake in *Azotobacter vinelandii* occurs through a GluP
23 transporter that is under the control of the CbrA/CbrB and Hfq-Crc systems. *Sci Rep* **7**: 858.
- 24 Ramos, J.L., Sol Cuenca, M., Molina-Santiago, C., Segura, A., Duque, E., Gomez-Garcia, M.R. et
25 al. (2015) Mechanisms of solvent resistance mediated by interplay of cellular factors in
26 *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Rev* **39**: 555-566.
- 27 Ramos-Fernández, A., Paradela, A., Navajas, R., and Albar, J.P. (2008) Generalized method for
28 probability-based peptide and protein identification from tandem mass spectrometry data and
29 sequence database searching. *Mol Cell Proteomics* **7**: 1748-1754.

- 1 Robinson, J.T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov,
2 J.P. (2011) Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**: 24-26.
- 3 Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for
4 differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139-140.
- 5 Rojo, F. (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and
6 interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 658-684.
- 7 Romsang, A., Duang-Nkern, J., Leesukon, P., Saninjuk, K., Vattanaviboon, P., and Mongkolsuk, S.
8 (2014) The iron-sulphur cluster biosynthesis regulator IscR contributes to iron homeostasis and
9 resistance to oxidants in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **9**: e86763.
- 10 Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring
11 Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 12 Schalk, I.J. (2008) Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: specificities and
13 characteristics of the pyoverdine pathway. *J Inorg Biochem* **102**: 1159-1169.
- 14 Schalk, I.J., and Guillon, L. (2013) Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer
15 membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm
16 depending on the siderophore pathways. *Amino Acids* **44**: 1267-1277.
- 17 Schwartz, C.J., Giel, J.L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F.J., Beinert, H., and Kiley, P.J.
18 (2001) IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia*
19 *coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14895-14900.
- 20 Sevilla, E., Silva-Jiménez, H., Duque, E., Krell, T., and Rojo, F. (2013) The *Pseudomonas putida*
21 HskA hybrid sensor kinase controls the composition of the electron transport chain. *Environ*
22 *Microbiol Rep* **5**: 291-300.
- 23 Shingler, V. (2003) Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to
24 attractive behaviour. *Environ Microbiol* **5**: 1226-1241.
- 25 Sonnleitner, E., Hagens, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., Habel, A., Jager, K.E., and Blasi, U. (2003)
26 Reduced virulence of a *hfq* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb Pathog* **35**: 217-228.
- 27 Sonnleitner, E., Schuster, M., Sorger-Domenigg, T., Greenberg, E.P., and Bläsi, U. (2006) Hfq-
28 dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in
29 *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **59**: 1542-1558.

- 1 Sonnleitner, E., Abdou, L., and Haas, D. (2009) Small RNA as global regulator of carbon catabolite
2 repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 21866-21871.
- 3 Sonnleitner, E., and Blasi, U. (2014) Regulation of Hfq by the RNA CrcZ in *Pseudomonas*
4 *aeruginosa* carbon catabolite repression. *PLoS Genet* **10**: e1004440.
- 5 Sonnleitner, E., Wulf, A., Campagne, S., Pei, X.Y., Wolfinger, M.T., Forlani, G. et al. (2017)
6 Interplay between the catabolite repression control protein Crc, Hfq and RNA in Hfq-dependent
7 translational regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res* gkx1245,
8 <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1245>.
- 9 Swingle, B., Thete, D., Moll, M., Myers, C.R., Schneider, D.J., and Cartinhour, S. (2008)
10 Characterization of the PvdS-regulated promoter motif in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
11 DC3000 reveals regulon members and insights regarding PvdS function in other
12 pseudomonads. *Mol Microbiol* **68**: 871-889.
- 13 Tiburzi, F., Imperi, F., and Visca, P. (2008) Intracellular levels and activity of PvdS, the major iron
14 starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **67**: 213-227.
- 15 Udaondo, Z., Molina, L., Segura, A., Duque, E., and Ramos, J.L. (2016) Analysis of the core
16 genome and pangenome of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **18**: 3268-3283.
- 17 Ugidos, A., Morales, G., Rial, E., Williams, H.D., and Rojo, F. (2008) The coordinate regulation of
18 multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. *Environ Microbiol*
19 **10**: 1690–1702.
- 20 Updegrove, T.B., Zhang, A., and Storz, G. (2016) Hfq: the flexible RNA matchmaker. *Curr Opin*
21 *Microbiol* **30**: 133-138.
- 22 Valentini, M., and Lapouge, K. (2013) Catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1
23 regulates the uptake of C4 -dicarboxylates depending on succinate concentration. *Environ*
24 *Microbiol* **15**: 1707-1716.
- 25 Valentini, M., García-Mauriño, S.M., Pérez-Martínez, I., Santero, E., Canosa, I., and Lapouge, K.
26 (2014) Hierarchical management of carbon sources is regulated similarly by the CbrA/B systems
27 in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Microbiology* **160**: 2243-2252.
- 28 Visca, P., Leoni, L., Wilson, M.J., and Lamont, I.L. (2002) Iron transport and regulation, cell
29 signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* **45**:
30 1177-1190.

- 1 Vogel, J., and Luisi, B.F. (2011) Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* **9**: 578-589.
- 2 Wagner, E.G., and Romby, P. (2015) Small RNAs in Bacteria and Archaea: Who They Are, What
3 They Do, and How They Do It. *Adv Genet* **90**: 133-208.
- 4 Watson, R.J., Millichap, P., Joyce, S.A., Reynolds, S., and Clarke, D.J. (2010) The role of iron
5 uptake in pathogenicity and symbiosis in *Photorhabdus luminescens* TT01. *BMC Microbiol* **10**:
6 177.
- 7 Wessel, D., and Flugge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute
8 solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**: 141-143.
- 9 Wilderman, P.J., Sowa, N.A., FitzGerald, D.J., FitzGerald, P.C., Gottesman, S., Ochsner, U.A., and
10 Vasil, M.L. (2004) Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas*
11 *aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9792-9797.
- 12 Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M. et al.
13 (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine
14 methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469-3478.
- 15 Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., and van der Lelie, D. (2011) Comparative
16 genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS*
17 *Microbiol Rev* **35**: 299-323.
- 18 Yuste, L., Canosa, I., and Rojo, F. (1998) Carbon-source-dependent expression of the *PalkB*
19 promoter from the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *J Bacteriol* **180**:
20 5218-5226.
- 21 Yuste, L., Hervás, A.B., Canosa, I., Tobes, R., Jiménez, J.I., Nogales, J. et al. (2006) Growth-phase
22 dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analyzed
23 with a genome-wide DNA microarray. *Environ Microbiol* **8**: 165-177.
- 24



Most relevant genes/functions altered in:

-Hfq-null strain

- Prophages
- Iron metabolism
- Electron transport chain
- Carbon metabolism
- Porins

-Crc-null strain

- Iron metabolism
- Sulphur metabolism
- Cytochromes

-Crc/Hfq-null strain

- Those of the Hfq-null strain plus:
- Intermediary metabolism
- Chemotaxis

